
Untersuchung von Protein- und Hydrationswasserdynamik mit Experimenten und Simulationen

**Investigations of the Dynamics of Protein and Hydration Water with
Experimental and Computational Methods**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Dissertation von Kerstin Kämpf, Dipl. Nanosc. aus Stralsund
Dezember 2014 — Darmstadt — D 17



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Fachbereich Physik
Institut für Festkörperphysik

Untersuchung von Protein- und Hydratationswasserdynamik mit Experimenten und Simulationen

Investigations of the Dynamics of Protein and Hydration Water with Experimental and Computational Methods

Genehmigte Dissertation von Kerstin Kämpf, Dipl. Nanosc. aus Stralsund

1. Gutachten: Prof. Dr. Michael Vogel

2. Gutachten: Prof. Dr. Franz Fajara

Tag der Einreichung: 18.11.2014

Tag der Prüfung: 15.12.2014

Darmstadt — D 17

Une théorie, c'est une histoire que se racontent les grandes personnes et qui explique comment marchent les choses. On croit qu'elle est vraie jusqu'à ce que quelqu'un en invente une autre qui explique mieux.

(Francois Lelord, Le Voyage d'Hector)

Eine Theorie ist eine Geschichte, die sich bedeutende Leute erzählen und die erklärt, wie die Dinge funktionieren. Man glaubt, dass sie wahr ist, bis irgend jemand eine andere Geschichte erfindet, die alles besser erklärt.

(Francois Lelord, Hektors Reise)



Abstract

Proteins are highly dynamic macromolecules, which exhibit dynamics over 13 orders of magnitude in time. Their dynamics enables protein functions and, thus, life [227, 255]. Protein dynamics is strongly influenced by the hydration shell. The mechanism of coupling as well as the characteristics of water dynamics are strongly debated. The question of whether water in the hydration shell shows strong [79] or fragile [59] temperature dependence, or even a fragile-to-strong transition [40] is discussed in relation to the so called 'dynamical transition' of the protein, a strong rise of motional amplitude upon heating at a temperature of $T \approx 180 - 220$ K [49]. Another enthralling feature of protein backbone dynamics is the anomalous protein dynamics, which manifests itself as a subdiffusive mean square displacement (MSD) and a power-law like or logarithmic-like behavior of correlation functions in the picoseconds to nanoseconds range [142]. Although it remains unclear in how far protein dynamics can be characterized using the terminology for ordinary glass forming liquids, like α - and β -relaxation, several approaches from the field of glassy dynamics have been proposed to rationalize these findings.

The investigation of protein and water dynamics over a broad range of time and length scales requires the combination of several experimental and computational methods. Here we combine quasi-elastic neutron scattering (QENS), ^2H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, and molecular dynamics (MD) simulations in order to investigate proteins of different structural complexity such as elastin, myoglobin and cyano-phycoyanin (CPC) at low levels of hydrations in the temperature range of 4-370 K. In this way we cover length scales between < 1 Å and several nm and times from sub-picoseconds to seconds.

The results indicate that at least two different protein processes have to be distinguished. The methyl group dynamics, which sets in at low temperatures ($T \approx 120$ K), is independent of the degree of hydration. It can be described by the rotational rate distribution model and a three-site jump and the presented results are in very good agreement with literature [221, 256]. The second process found is a small amplitude protein backbone dynamics, which sets in at $T \approx 180$ K and whose amplitude increases with temperature. While absent in QENS investigations of elastin, it is clearly found in ^2H NMR spectra of CPC and it is enhanced by hydration water. The signature of this process resembles a secondary relaxation process of liquids at the glass transition and is in qualitative agreement with the anomalous decay, which is investigated by MD simulations. The anomalous decay is analysed applying the energy landscape approach [9], the mode-coupling theory [156], and the fractional Ornstein-Uhlenbeck process [142]. We find that the Ornstein-Uhlenbeck process allows us to explain most, but not all characteristics of the anomalous protein dynamics in the intermediate time range. Clear indications of a protein α -process have not been found. The MD simulations rather hint towards an additional Rouse-like dynamics of the protein backbone, which deserves further investigation. Finally the water dynamics has been investigated. Although remaining preliminary, the analysis of QENS data does not seem to corroborate the proposed fragile-to-strong behavior of water, but is found in a better agreement with the strong temperature behavior found in previous NMR experiments [173]. As coupling mechanism a mutual influence of water and protein is indicated by MD simulations.

The chosen approach of combining three methods proves useful, in that a qualitative agreement is found for methyl group dynamics, protein backbone dynamics as well as for water dynamics.

Zusammenfassung

Proteine sind hochflexible Makromoleküle mit Dynamik über 13 Größenordnungen in der Zeit. Diese Dynamik ermöglicht Proteinfunktionen und damit das Leben [227, 255]. Proteindynamik wird stark von der Hydratationsschicht beeinflusst. Über den Mechanismus der Kopplung sowie die Eigenschaften der Wasserdynamik herrscht in der Literatur Uneinigkeit. Die Frage, ob das Wasser in der Hydratationsschicht eine starke [79] oder eine fragile [59] Temperaturabhängigkeit hat oder gar einen Fragil-Stark-Übergang aufweist, wird in Bezug auf den sogenannten „dynamischen Übergang“ des Proteins diskutiert. Dabei handelt es sich um einen starken Anstieg der Bewegungsamplitude bei Erwärmen bei einer Temperatur von $T \approx 180 - 220\text{ K}$ [49]. Eine weitere spannende Eigenschaft von Proteinen ist die anomale Proteindynamik, die sich als subdiffusives mittleres Verschiebungsquadrat und als potenzgesetzartiger, oder logarithmischer Zerfall der Korrelationsfunktionen im Picosekunden- bis Nanosekunden-Bereich zeigt [142]. Wenngleich unklar ist, inwiefern sich Proteindynamik mit der Terminologie für gewöhnliche Glasbildner - z.B. α - und β -Prozess - beschreiben lässt, wurden verschiedene Ansätze aus dem Gebiet der Glasdynamik vorgeschlagen, um den anomalen Abfall zu erklären.

Die Untersuchung der Protein- und Wasserdynamik über einen großen Bereich von Zeit- und Längenskalen erfordert die Kombination von verschiedenen Methoden. In dieser Arbeit werden quasielastische Neutronenstreuung (QENS), ^2H -Kernspinresonanz(NMR)-Spektroskopie und Molekulardynamik(MD)-Simulationen zur Untersuchung von Proteinen mit verschiedener struktureller Komplexität, Elastin, Myoglobin und Cyano-Phycocyanin (CPC) bei niedrigen Hydratationsgraden im Temperaturbereich von 4-370 K verwendet. Damit wird ein Längenskalenbereich von $< 1\text{ Å}$ bis zu einigen Nanometern sowie ein Zeitbereich von unter Pikosekunden bis Sekunden abgedeckt.

Die Ergebnisse zeigen, dass mindestens zwei dynamische Proteinprozesse unterschieden werden können. Die Methylgruppendiffusionsdynamik, die bei tiefen Temperaturen ($T \approx 120\text{ K}$) einsetzt, ist vom Hydratationsgrad unabhängig. Sie wird mittels des Rotationsraten-Verteilungsmodells in guter Übereinstimmung mit der Literatur [221, 256] beschrieben. Der zweite Prozess ist eine kleinamplitudige Rückgratdynamik, die bei $T \approx 180\text{ K}$ einsetzt und deren Amplitude mit steigender Temperatur zunimmt. Dieser Prozess ist in QENS an Elastin nicht zu sehen, jedoch wird er eindeutig in den ^2H -NMR-Spektren von CPC gefunden. Er wird durch die Anwesenheit von Hydratationswasser verstärkt. Dieser Prozess ähnelt einem sekundären Relaxationsprozess von Flüssigkeiten beim Glasübergang und er ist in qualitativer Übereinstimmung mit dem anomalen Abfall, der mit MD-Simulationen beobachtet wird. Der anomale Abfall wird mittels des Energielandschaftsansatzes [9], der Modenkopplungstheorie höherer Ordnung [156] und dem fraktionalen Ornstein-Uhlenbeck-Prozess [142] analysiert. Mit dem Ornstein-Uhlenbeck-Prozess können viele, jedoch nicht alle Charakteristika des anomalen Abfalls im intermediären Zeitbereich beschrieben werden. Ein Protein- α -Prozess konnte nicht identifiziert werden. Die Ergebnisse der MD-Simulationen zeigen dagegen Hinweise auf einen zusätzlichen Rouse-ähnlichen dynamischen Prozess des Protein-Rückgrats, der weiter untersucht werden sollte. Zuletzt wurde die Wasserdynamik untersucht. Die vorläufige Analyse der QENS-Ergebnisse scheint gegen den vorgeschlagenen Fragil-Stark-Übergang zu sprechen. Stattdessen liegt eine bessere Übereinstimmung mit der Arrhenius-Temperaturabhängigkeit vor, die in vorherigen NMR-Messungen an hydratisierten Proteinen erhalten wurde [173]. MD-Simulation deuten darauf hin, dass die Kopplung zwischen Wasser und Protein auf gegenseitiger Beeinflussung beruht.

Der vorgestellte Ansatz, drei Methoden zur Untersuchung von Proteindynamik zu kombinieren erweist sich als nützlich, dies wird durch eine qualitative Übereinstimmung der drei Methoden bezüglich der Methylgruppendiffusionsdynamik, Rückgratdynamik und Wasserdynamik untermauert.

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	1
2. Grundlagen	4
2.1. Vom Glas zum Protein - Dynamik in komplexen Systemen	4
2.1.1. Eigenschaften von unterkühlten Flüssigkeiten und Gläsern	5
2.1.2. Dynamik von Polymeren	10
2.1.3. Eigenschaften von Proteinen	11
2.2. Anomale Dynamik in Korrelationsfunktionen von Proteinen	14
2.2.1. Energielandschaftsansatz	15
2.2.2. Moden-Kopplungstheorie	18
2.2.3. Fraktionaler Fokker-Planck-Ansatz	21
2.3. Dynamischer Übergang	23
2.3.1. Experimentelle Befunde zum dynamischen Übergang	23
2.3.2. Interpretationsansätze	27
3. Methoden	33
3.1. Grundprinzipien einer spektroskopischen Messung	33
3.2. ² H-NMR-Spektroskopie	39
3.2.1. Grundlegendes	40
3.2.2. Messung der Relaxationszeit T_1	45
3.2.3. Messung von Spektren	46
3.2.4. Messung der Reorientierungskorrelationsfunktion	48
3.2.5. Random Walk Simulationen	50
3.3. Quasielastische Neutronenstreuung	52
3.3.1. Grundlagen	52
3.3.2. Neutronenstreuung am Rückstreuspektrometer SPHERES	56
3.3.3. Messungen und Details zur Auswertung	59
3.4. Molekulardynamik-Simulationen	61
3.4.1. Grundlegendes Funktionsprinzip	62
3.4.2. Simulation von Proteinen	64
3.4.3. Observablen	65
3.5. Vergleich der verwendeten Methoden	68
4. Materialien und Probencharakterisierung	71
4.1. Proteine	71
4.1.1. Verwendete Proteine	71
4.1.2. Bemerkungen zu den durchgeführten Messungen an Proteinen	73

4.2. Präparation und Charakterisierung der Cyano-Phycocyanin-Proben . . .	74
4.2.1. Handhabung der Probenpräparation	74
4.2.2. Anteil der Protonen in dynamisch unterscheidbaren Untergruppen	75
4.3. Präparation und Charakterisierung der Elastin-Proben	76
4.3.1. Nachweis von Eis mit dynamischer Differenz-Kalorimetrie	76
4.3.2. Hydratation in Atmosphäre mit definierter Feuchtigkeit	77
4.3.3. Handhabung der Probenpräparation	78
4.3.4. Anteil der Protonen in dynamisch unterscheidbaren Untergruppen	79
5. Untersuchung der Protein- und Wasserdynamik mit MD-Simulationen	81
5.1. Charakterisierung der Proteindynamik mit MD-Simulationen	81
5.1.1. Anomaler Abfall von Korrelationsfunktionen	82
5.1.2. Informationen über mikroskopische Proteindynamik	94
5.2. Charakterisierung der Wasserdynamik in MD-Simulationen	104
5.3. Zusammenspiel von Protein und Wasserdynamik	106
5.4. Zusammenfassung und Diskussion	111
6. Untersuchung der Protein- und Wasserdynamik mit ^2H-NMR-Spektroskopie	113
6.1. Charakterisierung der Rückgratbewegung von deuteriertem Cyano-Phycocyanin	113
6.1.1. Messungen von Spektren	114
6.1.2. Messungen der Spin-Gitter-Relaxationszeit	118
6.1.3. Stimulierte-Echo-Experimente	121
6.1.4. Einfluss des Hydratationsgrades auf die Proteindynamik	123
6.2. Konusmodelle	125
6.2.1. Berechnung von Spektren mit Random-Walk-Simulationen	125
6.2.2. Berechnung der Spin-Gitter-Relaxationszeit	130
6.3. Literaturüberblick: NMR-Untersuchungen des Hydratationswassers . . .	134
6.4. Zusammenfassung und Diskussion	136
7. Untersuchung der Protein- und Wasserdynamik mit quasielastischer Neutronenstreuung	139
7.1. Charakterisierung der Proteindynamik in Elastin	140
7.1.1. Experimentelle Daten	140
7.1.2. Interpretation mit dem Rotationsraten-Verteilungsmodell	145
7.2. Charakterisierung der Hydratationswasserdynamik	151
7.2.1. Separation des Streubeitrags von Wasser	152
7.2.2. Ansätze zur Modellierung der Wasserdynamik	154
7.3. Zusammenfassung und Diskussion	158
8. Vergleichende Diskussion	162
8.1. Vergleich der Ergebnisse zur Proteindynamik	162
8.1.1. Methylgruppenbewegung	162

8.1.2. Rückgratbewegung	165
8.2. Vergleich der Ergebnisse zur Dynamik des Hydratationswassers	167
8.3. Zusammenfassung und Diskussion	168
9. Zusammenfassung	174
Abbildungsverzeichnis	179
Tabellenverzeichnis	183
Literaturverzeichnis	184
Abkürzungsverzeichnis	205
A. Anhang	206
A.1. Kraftfelder der MD-Simulationen	206
A.2. Weitere Ergebnisse von MD-Simulationen	207
A.3. Weitere Ergebnisse von Random-Walk-Simulationen	207
A.4. Programmcode zur T_1 -Berechnung nach Lipari und Szabo	209
A.5. Sequenzen der verwendeten Proteine	211
A.5.1. Elastin	211
A.5.2. Myoglobin	212
A.5.3. Cyano-Phycocyanin	212
A.6. Streuintensität des Wasseranteils	212



1 Einführung

Proteine sind Grundbausteine des Lebens. Sie bestehen aus einigen zehn bis vielen hundert Aminosäuren, die kovalent miteinander verknüpft sind. Es gibt ca. 20 verschiedene, in Proteinen verwendete Aminosäuren, die zu einer enorm großen Zahl an Proteinen zusammengesetzt werden können.

Vielfältig ist auch die Zahl der von diesen Biomolekülen ausgeübten Mechanismen und Funktionen: Proteine dienen als Gerüststruktur, als Katalysatoren, Sensoren, Signalvermittler und vieles mehr. Grundlage dieser biologischen Funktionen ist das Zusammenspiel von Struktur und Dynamik der Proteine.

Die Struktur eines Proteins ist eine energetisch vorteilhafte dreidimensionale Anordnung der Aminosäurekette, die unter den jeweiligen Umgebungsbedingungen eingenommen wird. Sie variiert im Zeitverlauf zwischen verschiedenen, aber nicht beliebigen Konformationen und diese Variation wird durch die Proteindynamik beschrieben.

Die Proteindynamik umfasst alle Bewegungen eines Proteins wie z. B. Rotation, Translation, globale und lokale, intramolekulare Konformationsänderungen und Bindungsschwingungen [255]. Genau wie die Struktur ist auch die Dynamik von den jeweiligen Umgebungsbedingungen abhängig.

In einem Organismus liegen die meisten Proteine in einem wässrigen Milieu vor. Zwischen der Wasserdynamik und der Proteindynamik besteht eine starke Kopplung [42, 78]. Auf welche Art diese Kopplung vermittelt wird, ist jedoch noch umstritten [59].

Proteine sind hochflexibel. Ihre Dynamik erstreckt sich über 13 Größenordnungen in der Zeit [255]. Die schnellsten Bewegungen sind Schwingungen von kovalenten Bindungen sowie schnelle Seitenkettenrotationen, die sich im Piko- und Nanosekundenbereich abspielen. Große Konformationsänderungen, wie sie bei der Faltung / Entfaltung von Proteinen und der funktionell bedeutsamen Bindung von Liganden auftreten, können bis zu einige Minuten oder gar Stunden dauern und bilden das andere Ende der Spektrums der Proteindynamik.

Um die Dynamik auf breiter Zeitskala zu erforschen, ist eine Vielzahl an Methoden erforderlich. Dazu gehören: Röntgen- und Neutronenstreuung [80, 158, 168, 285], dynamische Differenz-Kalorimetrie (DSC) [123, 235], dielektrische Spektroskopie [37, 79], Mössbauerspektroskopie [34, 74], sowie NMR-Spektroskopie [149, 210]. Die Erforschung der schnellen Dynamik wurde darüber hinaus auch mit Molekulardynamik (MD)-Simulationen vorangebracht [105, 116, 252], mit denen gegenwärtig Trajekto-

rien von einigen 100 ns Länge für ein System aus 30 000 Teilchen routinemäßig simuliert werden können.

In der vorgestellten Arbeit werden Neutronenstreuung, NMR-Spektroskopie und MD-Simulationen zur Untersuchung der Protein- und Wasserdynamik in verschiedenen Protein-Wasser-Systemen eingesetzt. Die drei Methoden ergänzen sich hierbei im Hinblick auf die beobachteten Größen. Die Messmethoden der ^2H -NMR erlauben eine Charakterisierung lokaler Rotationsdynamik über ca. 10 Größenordnungen in der Zeit. Quasielastische Neutronenstreuung kann lokale und diffusive Bewegungen auflösen und mit MD-Simulationen ist die gesamte Trajektorie aller Atome zugänglich. Bei der Untersuchung wird zum einen ausgenutzt, dass die Methoden eine mikroskopische Charakterisierung der Bewegungsprozesse erlauben und zum anderen gelingt es, mittels Variation der Temperatur verschiedene Prozesse zu trennen.

Die behandelte Fragestellung lautet allgemein: Welche dynamischen Prozesse der internen Proteindynamik können mit NMR-Spektroskopie, MD-Simulationen und Neutronenstreuung beobachtet werden und inwiefern sind diese Prozesse von der Wasserdynamik beeinflusst?

Die einzelnen relevanten Fragestellungen werden nun verbunden mit einer Inhaltsübersicht über die Ergebniskapitel der Arbeit vorgestellt:

Der Fokus der Arbeit liegt auf der internen Proteindynamik. Damit ist jene Art von Bewegungen gemeint, die ein gefaltetes Protein ausführt, ohne als Gesamtmolekül eine Rotation oder Translation auszuführen. Mittels interner Bewegung kann ein Protein aus einer Konformation nach Überwindung einer Energiebarriere in eine neue Konformation übergehen. Auf diese Weise können alle für die Proteinfunktion wichtigen räumlichen Strukturen eingenommen werden. Proteine haben, wie andere Biopolymere und Polymere aber auch unterkühlte Flüssigkeiten und Gläser, eine komplexe Energielandschaft mit vielen lokalen Minima [280]. Dies legt die Vermutung nahe, dass sich ihre Dynamik mit ähnlichen Konzepten beschreiben lässt. Insbesondere ist von Interesse, inwieweit die Proteindynamik in Analogie zur Glasdynamik zutreffend beschrieben werden kann [62].

In Korrelationsfunktionen von Proteinen wird häufig ein extrem nicht-exponentieller Zerfall der Korrelation gefunden. Selbst ein gestreckt-exponentieller Kohlrausch-Williams-Watts Zerfall lässt sich nicht zur Beschreibung der Daten heranziehen, sondern es werden potenzgesetzartige oder logarithmische Abfälle beobachtet. Diese Dynamik wird anomale Proteindynamik genannt. Es gibt verschiedene Erklärungsansätze und Theorien zur Ursache dieses anomalen Zerfalls, die auf Grundlage von Modellen zur Beschreibung von Gläsern entwickelt wurden. Drei dieser Ansätze werden in Kapitel 5 verwendet, um MD-Simulationen von Proteinen zu analysieren.

In aktueller Diskussion befindet sich der sogenannte dynamische Übergang des Proteins. Dieser Ausdruck bezeichnet eine für viele Proteine experimentell gefundene Ände-

rung der Dynamik im Temperaturbereich von 180-220 K [49]. Ob es sich bei diesem Übergang um einen Glasübergang des Proteins handelt [37, 152] oder lediglich um einen Zeitfenstereffekt des jeweiligen Experiments [59], lässt sich nur mit Hilfe von mikroskopischen Informationen entscheiden. Hinweise auf das Einsetzen eines dynamischen Prozesses bei ca. 175 K liefern im Rahmen dieser Arbeit die Untersuchungen eines deuterierten Proteins mit ^2H -NMR-Spektroskopie (Kapitel 6).

Als eine mögliche Triebkraft des dynamischen Übergangs in Proteinen wird die Bewegung des Wassers angesehen. So schlagen Chen et al. vor, dass im Hydratationswasser eine qualitative Änderung der Temperaturabhängigkeit der Dynamik (ein sogenannter Fragil-Stark-Übergang) Ursache für das Einsetzen der Proteindynamik ist [40]. Diese Hypothese wird jedoch von anderen Autoren in Zweifel gezogen [59, 270]. In Kapitel 7 wird vorgestellt, inwieweit die Untersuchung des Proteins Elastin mit quasielastischer Neutronenstreuung zur Klärung dieser Frage beitragen kann.

In Kapitel 8 werden Verknüpfungen zwischen den Methoden beispielhaft aufgezeigt und die Ergebnisse aller Methoden vergleichend diskutiert. Schließlich werden die Ergebnisse in Kapitel 9 zusammengefasst.

2 Grundlagen

Die Untersuchung von Proteindynamik greift auf etablierte Konzepte zur Beschreibung von Dynamik in Flüssigkeiten, unterkühlten Flüssigkeiten, Polymeren sowie amorphen und kristallinen Festkörpern zurück. Zu jedem dieser Gebiete gibt es bereits ausführliche Einführungen [22, 57, 108, 182, 201]. Die Beschreibung der Grundlagen in dieser Arbeit setzt darauf auf und beschränkt sich auf die Vorstellung der Konzepte, die zur Beschreibung der Dynamik von Proteinen herangezogen werden.

Beginnend mit der Einführung der wichtigsten Eigenschaften von unterkühlten Flüssigkeiten, Gläsern und Polymeren soll in Kapitel 2.1 gezeigt werden, dass sich Proteine mit ähnlichen Konzepten beschreiben lassen. Einige dieser Theorien werden in Kapitel 2.2 näher vorgestellt. Insbesondere wird darauf eingegangen, wie im Rahmen dieser Theorien der in Proteinen und komplexen Systemen häufig beobachtete anomale Abfall der Korrelationsfunktionen¹ beschrieben werden kann.

Charakteristisch für das Zusammenspiel von Proteinen und Wasser ist das experimentell beobachtete Einsetzen eines dynamischen Prozesses bei einer Temperatur $T \approx 200\text{ K}$. Dieses Phänomen wird dynamischer Übergang genannt und wird in Kapitel 2.3 vorgestellt.

2.1 Vom Glas zum Protein - Dynamik in komplexen Systemen

Was haben Proteine und Gläser miteinander zu tun? Auf den ersten Blick handelt es sich bei den ersten um Makromoleküle mit hochgeordneter, komplexer Struktur, während mit dem zweiten Begriff amorphe Festkörper ohne Fernordnung bezeichnet werden. Dennoch weisen beide so große Ähnlichkeiten auf, dass es zulässig erscheint, für beide dieselben Theorien anzuwenden.

In diesem Kapitel sollen zunächst die wesentlichen Eigenschaften von unterkühlten Flüssigkeiten und Gläsern eingeführt werden. Anschließend wird mittels einer kurzen Einführung in die Polymerdynamik dargelegt, wie Eigenschaften von Kettenmolekülen berücksichtigt werden können und dann anhand der Eigenschaften von Proteinen gezeigt, was Proteine und glasbildende Systeme verbindet.

¹ Es kann sich dabei um verschiedene Korrelationsfunktionen handeln. In dieser Arbeit werden insbesondere Dichtekorrelationsfunktion und Orientierungskorrelationsfunktion betrachtet s. Kap. 3.

2.1.1 Eigenschaften von unterkühlten Flüssigkeiten und Gläsern

Für diesen Abschnitt wurden hauptsächlich folgende Übersichtsartikel herangezogen [36, 54, 66].

Bei Abkühlung einer Flüssigkeit unter Vermeidung von Kristallisation steigt die makroskopische Viskosität η in einem Temperaturbereich von nur wenigen 10 K um viele Größenordnungen an. Die Flüssigkeit wird immer zäher, bis sie schließlich als Festkörper vorliegt. Per Definition ist der feste Zustand bei jener Temperatur T_g erreicht, bei der die Viskosität einen Wert von $\eta \geq 1 \cdot 10^{13}$ Poise annimmt. Die Flüssigkeit ist zu einem Glas geworden. Dieses Phänomen wird als Glasübergang bezeichnet. Die Struktur der Flüssigkeit ändert sich beim Übergang ins Glas kaum.

Der Glaszustand ist ein thermodynamisch metastabiler Zustand. Der stabile Zustand des Systems ist bei den relevanten Temperaturen der kristalline Zustand. Der Grund dafür, dass eine Flüssigkeit statt in den energetisch günstigeren kristallinen Zustand in den Glaszustand übergeht, liegt in der hohen Energiebarriere zwischen beiden Bereichen der Energielandschaft. Auf mikroskopischer Ebene wird der feste Zustand erreicht, wenn sich ein Atom nicht mehr aus dem Käfig seiner Nachbarn befreien kann (vgl. Abb. 2.2(a)). Je größer die Abkühlrate, desto höher ist die Temperatur, bei der dieser Fall eintritt. Wird dem System jedoch durch Abkühlen mit einer langsameren Kühlrate Zeit gegeben, die Konfiguration (= Atomanordnung) mit der geringsten Entropie oder dem geringsten Volumen zu suchen, so kann die Glasübergangstemperatur gesenkt werden. Die Glasübergangstemperatur T_g hängt somit von der Kühlrate ab.

Bei der Glasübergangstemperatur T_g wird das System nichtergodisch². Dies führt zu einem Unterschied in der Wärmekapazität³ eines Glases verglichen zur unterkühlten Flüssigkeit. Dieser kann als Stufe der Temperaturabhängigkeit der Wärmekapazität C gemessen werden, beispielsweise mit dynamischer Differenzkalorimetrie (differential scanning calorimetry, DSC) (vgl. Kap. 4).

Die Temperaturabhängigkeit der Wärmekapazität eines Glases unterscheidet sich darüber hinaus auch bei sehr tiefen Temperaturen von der eines Kristalls. Während sie für ein Glas mit $C(T) \propto T$ ansteigt, wächst sie in kristallinen Festkörpern mit $C(T) \propto T^3$.

Zur Beschreibung der Dynamik in unterkühlten Flüssigkeiten und Gläsern wird zunächst mit dem einfachsten Fall einer Flüssigkeit begonnen. In einer Flüssigkeit lässt sich die Dynamik eines Atoms als Brownsche Bewegung beschreiben. Ein mikroskopisches Bild der Dynamik zeichnet die Beschreibung mittels der Langevin-Gleichung.

² Der Begriff Ergodizität besagt, dass ein Teilchen im Laufe der Zeit alle möglichen Konfigurationen durchläuft, somit ist das Zeitmittel einer Größe gleich dem Ensemblemittel des Gesamtsystems zu einem Zeitpunkt.

³ Die Wärmekapazität C ist ein Maß für die pro Temperaturänderung ΔT von einem Material aufgenommene Wärmemenge Q : $C = \frac{Q}{\Delta T}$.

Auf ein Teilchen wirkt demnach neben der Trägheitskraft $m\dot{v}(t)$, und der Reibungskraft $\xi v(t)$, eine stochastische Kraft $F(t)$, die durch die Stöße mit den umgebenden Teilchen verursacht wird ⁴

$$m\dot{v}(t) = -\xi v(t) + F(t). \quad (2.1)$$

Die Amplitude der fluktuierenden Kraft ist mit der Reibungskonstanten ξ verknüpft:

$$\langle F(t)F(t') \rangle = 2\xi k_B T \delta(t - t') \quad (2.2)$$

mit k_B als der Boltzmann-Konstanten. Diese Gleichung ist die Konsequenz des statischen Fluktuations-Dissipations-Theorems, das besagt, dass die Reaktion eines Systems auf eine von außen zugeführte Störung proportional zu den im Gleichgewicht vorherrschenden Fluktuationen ist. Die δ -Funktion zeigt, dass es sich bei dieser Art der Fluktuationen um weißes Rauschen handelt, da die Fouriertransformation zu einer frequenzunabhängigen Amplitude führt. Nach dem Gleichverteilungssatz $\frac{1}{2}m\overline{v^2} = \frac{1}{2}k_B T$ lässt sich daraus die von Einstein gefundene Beziehung für die Temperaturabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten K ableiten:

$$K = \frac{k_B T}{\xi} \quad (2.3)$$

Einen alternativen, deterministischen Ansatz zur Beschreibung von Brown'scher Molekularbewegung im Phasenraum eröffnet die Fokker-Planck-Gleichung. Statt die Kraft auf jedes einzelne Teilchen zu betrachten, wird hier nach der zeitlichen Entwicklung der Wahrscheinlichkeitsdichte $p(r, t)$ ein Teilchen zur Zeit t am Ort r zu finden unter Einwirkung eines Drifts a_1 und der Diffusion a_2 gefragt. Die Bewegungsgleichung für die Wahrscheinlichkeitsdichte lautet [141]:

$$\frac{\partial p(r, t)}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial r} [a_1 p(r, t)] + \frac{1}{2} \frac{\partial^2}{\partial r^2} [a_2 p(r, t)] \quad (2.4)$$

Unter Vernachlässigung des Driftkoeffizienten und der Annahme, dass a_2 unabhängig von r ist, ergibt sich daraus das 2. Fick'sche Gesetz, auch Diffusionsgesetz genannt:

$$\frac{\partial p(r, t)}{\partial t} = K \frac{\partial^2 p(r, t)}{\partial r^2} \quad (2.5)$$

mit dem Diffusionskoeffizienten K . Die Lösung dieser homogenen Differentialgleichung zweiter Ordnung ist durch eine Gaußverteilung für die Wahrscheinlichkeitsdichte $p(r, t)$ gegeben:

$$p(r, t) = \frac{1}{(4\pi K t)^{3/2}} \exp\left(-\frac{r^2}{(4K t)^2}\right). \quad (2.6)$$

⁴ Für Teilchen, die größer sind als die stoßenden Teilchen gilt, dass die Trägheitskraft vernachlässigt werden kann. Es wird dann die vereinfachte Langevin-Gleichung mit $m\dot{v} = 0$ zur Beschreibung verwendet. Dieser Ansatz wird als Brownsche Dynamik bezeichnet.

Die Orts- und Zeitabhängigkeit der Wahrscheinlichkeitsdichte sind im einfachsten Fall voneinander unabhängig. Die Wahrscheinlichkeitsdichte lässt sich folglich in eine Sprunglängen- und eine Wartezeitenverteilung faktorisieren.

Durch Variation der Temperatur ändert sich, wie oben eingeführt, die Viskosität einer Flüssigkeit. Die mit der Änderung der Viskosität einhergehende mikroskopische Dynamik lässt sich mit Hilfe von zeitabhängigen Korrelationsfunktionen einer dynamischen Variable, wie zum Beispiel einer Dichtekorrelationsfunktion oder einer Orientierungskorrelationsfunktion $\phi(t)$ messen. Im Fall einer einfachen Flüssigkeit fällt die Korrelationsfunktion exponentiell mit der Zeit ab

$$\phi(t) = \exp\left(-\frac{t}{\tau_\alpha}\right). \quad (2.7)$$

Der Parameter τ_α , die Korrelationszeit, ist proportional zur Viskosität und ändert sich beim Glasübergang als Funktion der Temperatur ebenfalls über mehr als 10 Größenordnungen. Überschreitet die Korrelationszeit τ_α den Wert von 100s wird von einem Glas gesprochen. $\tau_\alpha(T)$ lässt sich meist gut mit der sogenannten Vogel-Fulcher-Tammann-Gleichung beschreiben:

$$\tau_\alpha = \tau_0 \exp\left(\frac{B}{(T - T_0)}\right). \quad (2.8)$$

Im allgemeinen wird $T_0 \approx T_g - 50 \text{ K}$ gefunden [2].

Für $T_0 = 0 \text{ K}$ lässt sich daraus die Arrhenius-Gleichung ableiten

$$\tau_\alpha = \tau_0 \exp(E_a/k_B T). \quad (2.9)$$

Die Arrhenius-Gleichung beschreibt thermisch aktivierte Dynamik, wie sie mit dem Überspringen einer Energiebarriere der Höhe E_a verbunden ist.

Beide Temperaturabhängigkeiten werden experimentell beobachtet. Sie sind schematisch in Abbildung 2.1 a) dargestellt. Das Arrhenius-Verhalten wird in Netzwerkgläsern wie SiO_2 gefunden und wird als „starke“ Temperaturabhängigkeit bezeichnet. Das Vogel-Fulcher-Tammann-Gesetz („fragil“) wird z.B. für Toluol und Glycerin gefunden.

τ_α , die Relaxationszeit des α -Prozesses, beschreibt den strukturellen Relaxationsprozess in Flüssigkeiten und unterkühlten Flüssigkeiten⁵, das heißt anschaulich, dass sich ein Teilchen auf dieser Zeitskala neue Nachbarn sucht.

In unterkühlten Flüssigkeiten zeigt die α -Relaxation einen gestreckt-exponentiellen Abfall. Dieser Abfall wird mit der sogenannten Kohlrausch-Williams-Watts(KWW)-Gleichung beschrieben:

$$\phi(t) = A \exp\left(-\left(\frac{t}{\tau_\alpha}\right)^\beta\right). \quad (2.10)$$

⁵ Die Bezeichnung stammt aus Untersuchungen mit dielektrischer Spektroskopie. Hierin wurden in unterkühlten Flüssigkeiten als Funktion der Frequenz ein oder mehrere Relaxationspeaks gefunden und fortlaufend mit α , β , und so weiter, bezeichnet.

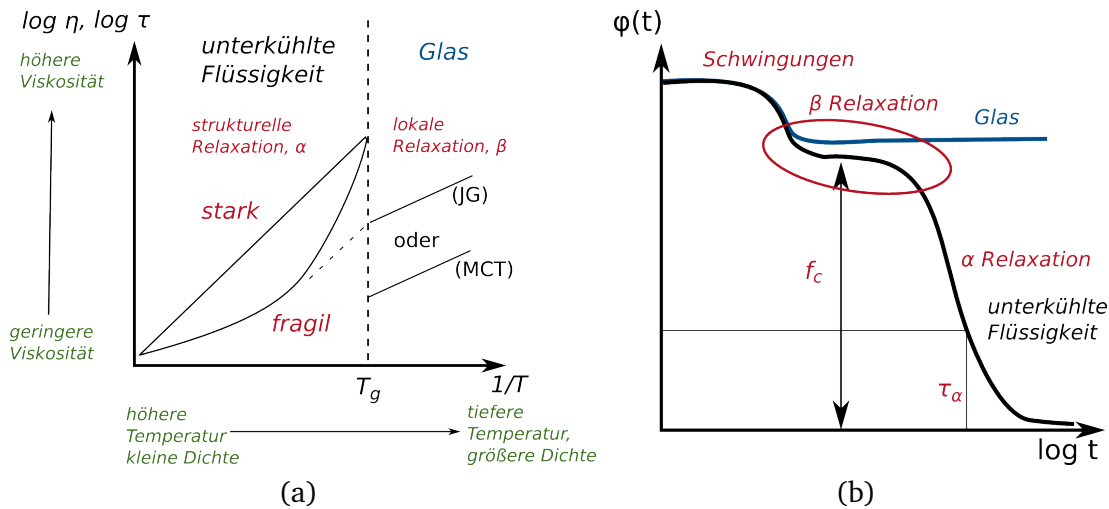


Abb. 2.1: a) Veranschaulichung der Temperaturabhängigkeit der Relaxationszeit in der Angell-Auftragung. Der Glasbildner ist fragil oder stark. Im Glas findet nur noch die β -Relaxation statt. Für die sekundäre Relaxation gibt es in der Literatur unterschiedliche Definitionen. Zwei mögliche Verläufe sind eingezeichnet. b) Der Korrelationsabfall erfolgt in unterkühlten Flüssigkeiten zweistufig, im Glas endet er auf einem Plateauwert.

Der gestreckt-exponentielle Abfall kann durch zwei Grenzfälle erklärt werden, das homogene und das heterogene Szenario. Im Grenzfall des homogenen Szenarios wird ein intrinsisch nichtexponentieller Korrelationsabfall angenommen, d.h. die Korrelationsfunktion jedes Teilchens ist nichtexponentiell. Im Grenzfall des heterogenen Szenarios wird die Streckung des Abfalls durch eine Verteilung von Korrelationszeiten $g(\tau)$ erklärt, der Korrelationsabfall eines einzelnen Teilchens ist weiterhin exponentiell. In unterkühlten Flüssigkeiten gilt das heterogene Szenario als wahrscheinlicher [36, 66]. Im heterogenen Szenario weicht die mittlere Korrelationszeit von der $1/e$ -Abfallszeit ab. Sie wird über

$$\langle \tau \rangle = \frac{\tau}{\beta} \Gamma \left(\frac{1}{\beta} \right) \quad (2.11)$$

bestimmt. Mit $\Gamma(x)$ als der Gammafunktion: $\Gamma(x) = \int_0^\infty t^{x-1} e^{-t} dt$.

In Gläsern ist die α -Relaxation eines Teilchens durch seine Nachbarn verhindert, das Teilchen kann den Käfig der Nachbarn nicht mehr verlassen. Die Korrelationsfunktion fällt nicht auf Null ab, sondern endet auf einem Wert $f_c > 0$ (vgl. Abb.2.2(b)). Dieser Wert wird, insbesondere in der später eingeführten Modenkopplungstheorie, als Nichtergodizitätsparameter bezeichnet. Bereits oberhalb der Glastemperatur wird der Effekt der Nachbarn deutlich: die Korrelationsfunktion fällt in zwei Stufen ab (s. Abb. 2.2). Der Kurzzeitabfall wird durch Vibrationen der Teilchen im Käfig aus den umgebenden Nachbarn verursacht, der Langzeitabfall ist der α -Prozess. Die Stufen des Abfalls sind dabei mit sinkender Temperatur von einem immer längeren Plateau getrennt.

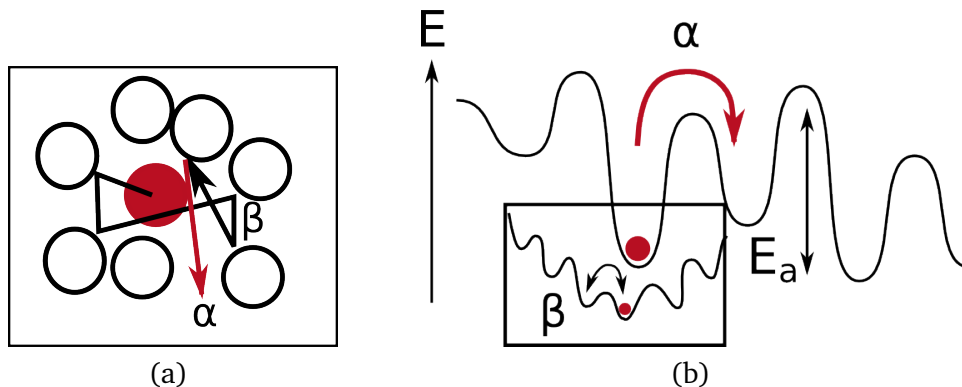


Abb. 2.2: a) In einer unterkühlten Flüssigkeit bewegt sich ein Teilchen zunächst im Käfig aus den umgebenden Nachbarn und kann nur eine Teilrelaxation ausführen. Erst wenn der Käfig verlassen wird, findet die sogenannte strukturelle oder α -Relaxation statt. Im Energielandschaftsbild lässt sich die β -Relaxation als ein Explorieren verschiedener Minima in einem größeren Potential, und der α -Prozess dem Überspringen einer Energiebarriere zwischen zwei größeren Minima vorstellen.

Obleich die α -Relaxation in Gläsern nicht mehr beobachtet wird, ist ein Glas nicht statisch. Viele Gläser zeigen Teilrelaxationen der Korrelationsfunktionen mittels β -Prozessen. Der Begriff β -Relaxation wird in der Literatur nicht einheitlich verwendet⁶. Hier wird mit dem Begriff β -Relaxation ein lokaler, nichtkooperativer Prozess bezeichnet.

Aus diesem Überblick lassen sich folgende wesentliche Kennzeichen für Gläser zusammenfassen:

- Gläser haben die Struktur einer Flüssigkeit (Nahordnung, aber kein Fernordnung).
- Sie sind metastabil (nichtergodisch).
- Der Abfall der Korrelationsfunktion oberhalb von T_g ist zweistufig, die α -Relaxation oberhalb T_g ist nichtexponentiell.
- In Gläsern liegt eine breite Verteilung von Korrelationszeiten vor.
- Die Temperaturabhängigkeit der Wärmekapazität C zeigt eine Stufe beim Glasübergang und ist proportional zur Temperaturen $C \propto T$ für tiefe Temperaturen.

Diese Kennzeichen werden in Abschnitt 2.1.3 zum Vergleich mit Proteinen herangezogen. In der Literatur existieren verschiedene Ansätze zur Beschreibung des Glasübergangs wie z.B. die Adam-Gibbs-Theorie [2], der Energielandschaftsansatz [93], die

⁶ In der Modenkopplungstheorie werden die Relaxationsprozesse um das Plateau herum als frühe und späte β -Relaxationen bezeichnet [143, 218]. Darüber hinaus wird die Johari-Goldstein(JG)- β -Relaxation von den anderen sekundären Relaxationen unterschieden. Sie bezeichnet einen Vorläuferprozess des α -Prozess, der bei $T > T_g$ mit der α -Relaxation verschmilzt. Einen guten Überblick über Eigenschaften von β -Prozessen gibt der Übersichtsartikel von Ngai [196].

Modenkopplungstheorie [94], und die Random-First-Order-Theorie [171]. Einen guten Überblick über die verschiedenen Theorien mit vielen Literaturhinweisen gibt der Artikel von Cavagna [36]. Im Rahmen dieser Arbeit werden der Energielandschaftsansatz und die Modenkopplungstheorie näher betrachtet. Sie werden in Kap. 2.2 näher beschrieben.

2.1.2 Dynamik von Polymeren

Nicht nur einfache Flüssigkeiten weisen bei Abkühlung einen Glasübergang auf. Auch viele Polymerschmelzen lassen sich unterkühlen und in den Glaszustand bringen. Polymere weisen auf solchen Zeit- und Längenskalen Ähnlichkeiten zu molekularen Gläsern auf, wenn die kovalente Verknüpfung der Atome keine Rolle spielt. Dies ist für kurze Zeiten und tiefe Temperaturen der Fall. Für längere Zeiten und hohe Temperaturen dagegen treten Ketteneffekte auf. Ansätze, um diese Verknüpfung zu berücksichtigen, wurden für Dynamik von Polymeren in Lösemitteln und Schmelzen entwickelt.

Besonders erfolgreich [30, 111, 112] sind das Rouse-Modell und dessen Erweiterung das Röhren-Reptationsmodell, die im Doi-Edwards-Modell zusammengefasst werden [57]. Es wird in den Kapiteln 5 und 8 zur Interpretation herangezogen.

Im Rouse-Modell wird ein Polymer als eine Kette von R_N Massenpunkten an den Orten \vec{R}_n angesehen, die über Federn miteinander verbunden sind. Die Anordnung der Massenpunkte entspricht einem Random-Walk, die Kette ist folglich als gaußsches Knäuel aufzufassen. Jeder Massenpunkt führt eine Brownsche Bewegung aus und kann mittels der Langevin-Gleichung (2.1) beschrieben werden. Zusätzlich wirken die Rückstellkräfte der Federn, quantifiziert durch die Federkonstante k auf das Teilchen. Es ergibt sich folgende Darstellung für Gleichung (2.1):

$$\xi \frac{d\vec{R}_n}{dt} = -k(2\vec{R}_n - \vec{R}_{n+1} - \vec{R}_{n-1}) + \vec{f}_n, \quad (n = 1, 2, \dots, N_R - 2). \quad (2.12)$$

Die Wechselwirkung des Polymers mit dem umgebenden Lösemittel, bzw. in einer Polymerschmelze mit den umgebenden Polymermolekülen wird über einen Reibungsterm ξ parametrisiert.

Im Doi-Edwards-Modell wird die Zeitskala der Polymerdynamik in fünf unterschiedliche Bereiche geteilt. Einen Überblick über diese fünf Bereiche gibt Abbildung 2.3. Im kürzesten Zeitfenster $t < \tau_\alpha$ herrscht Glasdynamik vor. Die Korrelationsfunktion $\phi(t)$ kann wie oben beschrieben mit einem zweistufigen Abfall beschrieben werden, dessen hinterer Teil eine gestreckt-exponentielle Form hat.

Für einfache Flüssigkeiten führt die gestreckt-exponentielle Relaxation zum vollständigen Korrelationsverlust. Für Polymere hingegen schließt sich der Rouse-Bereich an. Das mittlere Verschiebungsquadrat steigt mit $\langle r^2(t) \rangle \propto t^{0.5}$, die Korrelationsfunktion $\phi(t) \propto t^{-1}$ fällt mit einem Potenzgesetz ab.

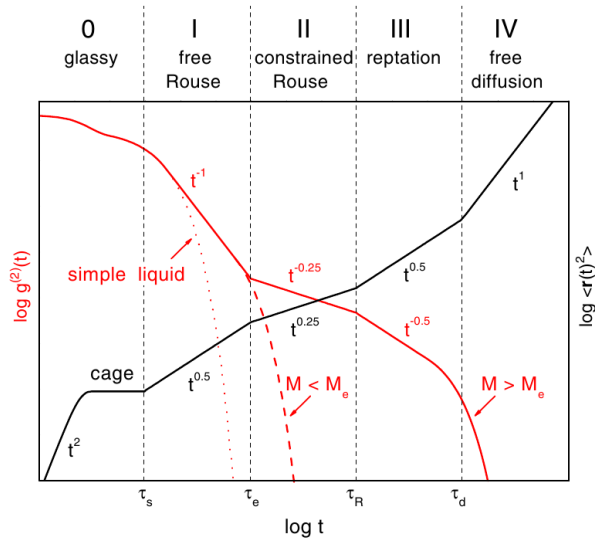


Abb. 2.3: Schematische Zeitabhängigkeit der Korrelationszeit (links) und des mittleren Verschiebungsquadrats nach dem Doi-Edwards-Modell. Entnommen aus [226]. Die α -Relaxationszeit ist hier als τ_g bezeichnet.

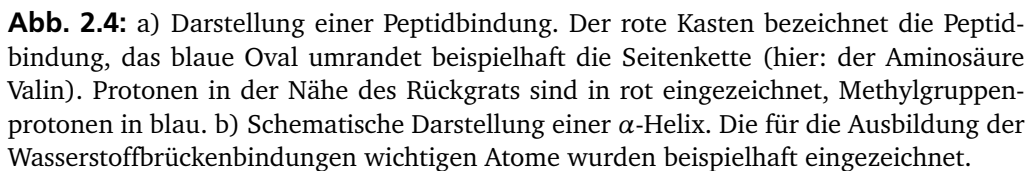
Hat das Polymer eine ausreichende Länge, so bilden sich Verschlaufungen (engl. entanglement). Diese Verschlaufungen führen zu $\langle r^2(t) \rangle \propto t^{0.25}$ und $\phi(t) \propto t^{-0.25}$ (im Bild mit „constrained rouse“ bezeichnet). Bei noch längeren Zeiten bewegt sich das Polymer in Richtung der Kette in einer kriechenden (engl. reptation) Bewegung, bevor schließlich die Schwerpunktdiffusion der Moleküle eine freie Diffusion ausführt, die zu einem vollständigen Korrelationsabfall führt. Eine weiterführende Einführung in das Rousemodell wurde in der Dissertation von André Bormuth gegeben [29].

Proteine sind Polymere aus Aminosäuren. Dennoch wurde das Rousemodell bisher nur in wenigen Arbeiten zur Interpretation von Proteindynamik herangezogen [11, 99, 135, 192].

Nach der einführenden Darlegung der Dynamik in unterkühlten, einfachen Flüssigkeiten und in Polymeren wenden wir uns nun den Proteinen zu.

2.1.3 Eigenschaften von Proteinen

Proteine sind Polymere aus Aminosäuren. Ein kurzer Ausschnitt aus der Sequenz (Aminosäurenabfolge) des Proteins ist in Abb. 2.4 gezeigt. Die Peptidbindung (roter Kasten) ist durch den partiellen Doppelbindungscharakter der C-N-Bindung starr und kann nicht frei rotieren [262]. Jede Aminosäure ist durch ihre Restgruppe R spezifiziert. Es gibt 20 verschiedene proteinogene Aminosäuren, die sich unter anderem in ihrer Hydropathie unterscheiden.



Die Sekundärstruktur fixiert das Proteinrückgrat durch Wasserstoffbrückenbindungen relativ zu weiter entfernten Kettenabschnitten. Eine Reptationsbewegung wie in Polymeren ist deshalb in gefalteten Proteinen nicht möglich. Stattdessen führen das Rückgrat und die Seitenketten Librationsbewegungen aus [5, 119, 120]. Darüber hinaus ist experimentell sowohl in Neutronenstreuung, als auch in ^2H -NMR die schnelle Dreiplatzsprungbewegung der Methylgruppenprotonen [44] von der Bewegung der übrigen Protonen zu unterscheiden. Diese Unterscheidbarkeit wird in den Kapiteln 6 und 7 genutzt, um die Methylgruppenbewegung von Rückgrat- bzw. Wasserdynamik der Probe abzutrennen. Die Methylgruppen sind in Abbildung 2.4(a) in blau eingezeichnet.

12

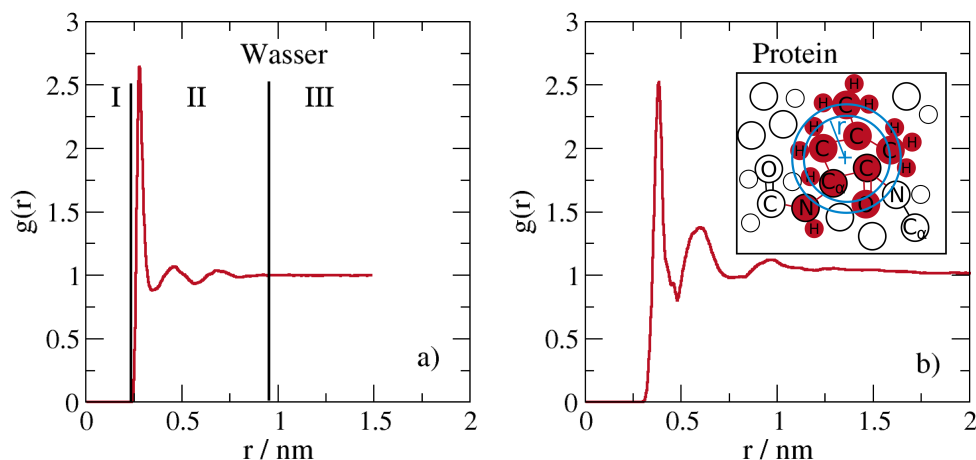


Abb. 2.5: Radiale Paarverteilungsfunktion $g(r)$ a) der Sauerstoffe in SPC-Wasser ($g_{OO}(r)$, $T = 300\text{ K}$) und b) der Aminosäureschwerpunkte von Elastin bei $T = 310\text{ K}$.

keit. Für diese Gegenüberstellung kann die radiale Paarverteilungsfunktion $g_{AB}(r)$ ⁷ herangezogen werden. Die radiale Paarverteilungsfunktion ist in Abb. 2.5(a) für die Sauerstoffatome in Wasser aufgetragen. $g_{OO}(r)$ zeigt eine typische Flüssigkeitsstruktur mit einem Ausschlussradius, in dem keine Atome zu finden sind (Bereich I), dann einer Nahordnung (Bereich II) und schließlich der Isotropie mit $g_{OO}(r) = 1$ für große Abstände (Bereich III). In Proteinen wurde die radiale Paarverteilungsfunktion im Abstand r vom Massenschwerpunkt jeder Aminosäure (blaues Plus in Abb. 2.5(b)(inset)) berechnet. Auf diese Art ergibt sich eine vergleichbare, flüssigkeitsähnliche Nahordnung (s. Abb. 2.5(b)).

In dieser Abstraktion der Proteinstruktur ähnelt das Protein strukturell einer Flüssigkeit oder einem Glas. Ebenso wie in Gläsern gibt es in Proteinen dynamische Heterogenitäten und breite Verteilungen von Korrelationszeiten [9, 79, 81, 121]. Die Vielzahl zugänglicher Konfigurationen spiegelt sich zum einen im Tieftemperaturverhalten von Proteinen wider. So wird bei sehr tiefen Temperaturen ein linearer Anstieg der Wärmekapazität mit der Temperatur gefunden [145, 212, 244]. Zum anderen konnte in einigen Proteinen eine Stufe in der Wärmekapazität ähnlich jener gefunden werden, die bei Glasbildnern am Glasübergang zu sehen ist, wenn die Freiheitsgrade des α -Prozesses ausfrieren [123, 190, 205, 229, 230].

Anzeichen für Metastabilität fanden Iben et al. [121], andere Autoren nehmen an, dass sich Proteine im gefalteten Zustand in einem globalen Minimum befinden [6, 159], das nur gegenüber intermolekularer Aggregation metastabil ist [257]. Schließlich wurden von einigen Autoren auch die beiden Relaxationsprozesse, die α - und die β -Relaxation

⁷ Die radiale Paarverteilungsfunktion beschreibt die relative Häufigkeit mit der ein Teilchen B im Abstand r vom einem Teilchen A gefunden wird, normiert auf die Häufigkeit in einem idealen Gas. Durch Fouriertransformation kann daraus der statische Strukturfaktor $S(q)$ gewonnen werden.

in Proteinen⁸ zugeordnet [74, 196]. Die Prozesse wiesen die charakteristischen Temperaturabhängigkeiten (Arrhenius für β -Relaxation und Vogel-Fulcher-Tammann für die α -Relaxation) auf.

Die Vergleichbarkeit von Gläsern und Proteinen endet, beim Blick auf die Abmessungen. Die Ausdehnung eines makroskopischen Glases ist im Vergleich zum Abstand zwischen den Atomen unendlich, während die Größe eines Proteins nur etwa eine Größenordnung größer ist, als eine kovalente Bindung [77]. An der Oberfläche des Proteins befindet sich dann das Hydratwasser und kann Einfluss auf die Proteindynamik nehmen. Zudem kann ein ausreichend hydratisiertes Protein bei hohen Temperaturen denaturieren. Für diese Situationen gibt es keine Analogie in Gläsern.

Insgesamt gibt es viele Ähnlichkeiten und Gemeinsamkeiten von Proteinen und Gläsern in Bezug auf ihre strukturellen und dynamischen Eigenschaften. Eine Übertragung von Glas-theorien auf Proteine erscheint daher naheliegend. Diese Übertragung wird für das Energielandschaftsmodell und die Modenkopplungstheorie im folgenden Abschnitt vorgestellt. Sie wird in Kap. 5 anhand von Molekulardynamik-Simulationen von Proteinen überprüft.

2.2 Anomale Dynamik in Korrelationsfunktionen von Proteinen

Korrelationsfunktionen von Proteinen und anderen komplexen dynamischen Systemen zeichnen sich durch einen anomalen Abfall aus [156, 241, 286]. Unter normaler Dynamik wird ein Verhalten von zeitabhängigen Korrelationsfunktionen verstanden, das einem exponentiellen oder gestreckt-exponentiellen Gesetz folgt. Anomale Dynamik ist demgegenüber ein stärker gestreckter Abfall, der sich eher mit einem Potenzgesetz oder einem logarithmischen Gesetz beschreiben lässt. Gleichzeitig weist das mittlere Verschiebungsquadrat (MSD) einen sublinearen Anstieg auf

$$\langle r^2 \rangle \propto t^\alpha \quad \text{mit} \quad 0 < \alpha < 1. \quad (2.13)$$

Für den Ursprung des subdiffusiven Verhaltens gibt es eine anschauliche Erklärung [108]. Dafür wird das MSD $\langle r^2(t) \rangle$ im Rahmen eines diskreten Random Walks betrachtet. Für den einfachen Fall eines Random Walks aus zwei Schritten gilt

$$\langle r^2(t) \rangle = \langle (r_1 + r_2)^2 \rangle = \langle r_1^2 \rangle + \langle r_2^2 \rangle + 2\langle r_1 \cdot r_2 \rangle. \quad (2.14)$$

Im Fall normaler Diffusion ist die vom Teilchen im Zeitintervall 1 zurückgelegte Strecke r_1 unabhängig von der im zweiten Schritt zurückgelegten Strecke r_2 . Es tritt keine

⁸ Sowohl in den Modellen der Glasdynamik als auch in Polymer- und Proteindynamik wird der Begriff α -Relaxation verwendet. In beiden Fällen wird damit bezeichnet, dass das untersuchte Teilchen den Käfig der umgebenden Nachbarn verlässt. Während für einfache Flüssigkeiten die α -Relaxationszeit proportional zur Viskosität ist, ist dies in langkettigen polymeren Systemen nicht mehr der Fall. Der viskositätsgekoppelte Prozess ist in Polymerschmelzen die Diffusion der Polymerschwerpunkte.

Korrelation zwischen den Richtungen zweier aufeinander folgender Schritte, und der dritte Summand in Gleichung (2.14), der Kreuzkorrelationsterm, fällt demnach weg. Ein Prozess, der diese Bedingung erfüllt, der also kein längeres Gedächtnis hat, erfüllt die Markov-Eigenschaft. Umgekehrt lässt sich daraus schließen, dass Subdiffusion zu finden ist, wenn es eine Rückkorrelation zwischen aufeinander folgenden Schritten gibt. Subdiffusion ist folglich nicht-markovsch.

Der für Subdiffusion notwendige Gedächtniseffekt lässt sich im Rahmen verschiedener Ansätze beschreiben. Dazu zählt die Annahme von korreliertem Rauschen in der generalisierten Langevin-Gleichung [146, 185] und in der Modenkopplungstheorie [41, 63, 156], sowie die Annahme einer divergierenden Sprunglängen- oder Wartezeitenverteilung [183, 184], die einerseits im Energielandschaftsbild durch bestimmte Formen der Energiebarrierenverteilung erhalten werden können [4, 9, 156] oder die andererseits mit der fraktionalen Fokker-Planck-Gleichung (FFP) beschrieben werden können [142, 183].

In dieser Arbeit werden drei Ansätze zur Beschreibung von Subdiffusion näher betrachtet und im Folgenden genauer eingeführt. Bei den drei Ansätzen handelt es sich um den Energielandschaftsansatz von Frauenfelder, die Modenkopplungstheorie höherer Ordnung, und den Spezialfall der fraktionalen Fokker-Planck-Gleichung, den fraktionalen Ornstein-Uhlenbeck-Prozess.

2.2.1 Energielandschaftsansatz

Der Energielandschaftsansatz wird in drei Schritten vorgestellt. Zunächst wird das Konzept eingeführt, wie es ursprünglich für Gläser entwickelt wurde. Dann wird dargelegt, in welcher Form das Modell für Proteine modifiziert wurde und schließlich wird erklärt, wie der Energielandschaftsansatz zur Beschreibung von anomaler Dynamik dienen kann.

Normale Dynamik im Energielandschaftsbild

Die dynamische Heterogenität und viele andere Eigenschaften von unterkühlten Flüssigkeiten und Gläsern können in einem Energielandschaftsbild [93, 113] beschrieben werden. Dieses Bild arbeitet im Konfigurationsraum. Jede mikroskopische Konfiguration des Systems, d.h. jeder Punkt im Konfigurationsraum, besitzt eine potentielle Energie. Der Konfigurationsraum bildet folglich eine $3N$ -dimensionale Energielandschaft. Diese besitzt für ein komplexes dynamisches System eine Vielzahl an Potentialminima. Um von einem Minimum in der Energielandschaft in ein anderes zu gelangen, muss eine Energiebarriere durch eine aktivierte Dynamik überwunden werden. Im mikroskopischen Bild entspricht das Überwinden einer Barriere der lokalen Umlagerung einer kleinen Zahl von Teilchen. Die mit solchen Umlagerungen verbundenen Energien sind unterschiedlich hoch (s. Abb. 2.2(b)). Daraus ergibt sich eine Wartezeitenverteilung.

Die α -Relaxation kann in diesem Bild dem Überschreiten einer hohen Energiebarriere durch einen kooperativen Prozess, also durch Umlagerungen von mehreren benachbarten Teilchen, zugeordnet werden. Die β -Relaxation entspricht einem nicht-kooperativen Überwinden einer einzelnen Energiebarriere⁹. Für beide Prozesse kann eine Energiebarrierenverteilung vorliegen.

Für die Energiebarrierenverteilung $g(E)$ kann im einfachsten Fall eine Gaußverteilung angenommen werden

$$g(E) = N \exp \left(-\frac{(E - E_m)^2}{2\sigma_E^2} \right). \quad (2.15)$$

Hierin ist E_m die mittlere Energiebarrierenhöhe, und σ_E die Breite der gaußschen Energiebarrierenverteilung. Aber auch andere Verteilungen von Energiebarrieren werden herangezogen, um Dynamik zu erklären (vgl. Kap. 3.1).

Das einzelne Überwinden einer Energiebarriere ist ein exponentieller Prozess. Das Energielandschaftsbild ist somit ein Beispiel für ein heterogenes Szenario. Die mittlere Relaxationszeit hängt gemäß Gleichung (2.9) vom Verhältnis der Energiebarrierenhöhe E_A und der thermischen Energie $k_b T$ ab. Eine mit abnehmender Temperatur zunehmend stärker kooperative Dynamik führt in diesem Bild zu einem Vogel-Fulcher-Tammann-Gesetz (s. Gl. (2.8)) [67].

Proteindynamik im Energielandschaftsbild

Das Konzept einer Energielandschaft wurde bereits vielfach für Proteine verwendet [39, 133, 242, 280]. Von Frauenfelder et al. wurde es für Proteine weiterentwickelt, um funktionelle Bewegungen erklären zu können [81]. Frauenfelder geht dazu von einer hierarchisch strukturierten Energielandschaft aus. Diese ist in Abbildung 2.6 schematisch veranschaulicht. Große Konformationsänderungen, wie sie zum Beispiel in bifunktionellen Proteinen zur Änderung der Funktion notwendig sind¹⁰, sind mit dem Überwinden hoher Energiebarrieren verbunden. Die darunter liegende Ebene der Energielandschaft beschreibt nach Frauenfelder solche Energiebarrieren, die am α -Prozess beteiligt sind und die unterste Ebene schließlich Gleichgewichtsfluktuationen des Proteins. Im Bild von Frauenfelder koppeln sie an β -Fluktuationen des Hydratationswassers und werden deshalb β_h -Fluktuationen genannt [74].

⁹ Die β -Relaxation nach Goldstein wird auf einen lokalen Bewegungsprozess innerhalb von „Islands of Mobility“ zurückgeführt. Im Gegensatz dazu zeigte eine experimentelle Untersuchung an Sorbitol von Wagner et al. mit Solvatationsdynamik, dass alle Moleküle am β -Prozess teilnehmen [278]. Diese Beobachtung wird von NMR-Experimenten bestätigt, die zudem die (Johari-Goldstein-) β -Relaxation als kleinamplitudigen Prozess charakterisieren [274, 275]. Kürzlich wurde darüber hinaus auch eine mögliche Kooperativität des β -Prozesses diskutiert [25].

¹⁰ Das bekannteste Beispiel für ein bifunktionelles Enzym ist die Phosphofruktokinase-2/Fructose-2,6-bisphosphatase [262]. Dieses Protein kann einerseits einen Schritt in der Glykolyse, der wichtigsten Energiegewinnungsreaktion im Stoffwechsel, katalysieren, oder andererseits helfen Glukose zu bilden. Um zwischen den Funktionen zu wechseln, muss es eine große Konformationsänderung ausführen. Mit diesen beiden Funktionen ist es eines der wichtigen Enzyme in unserem Stoffwechsel.

Wie kann man nun in diesem Bild anomale Dynamik beschreiben? Bei tiefen Temperaturen lassen sich die β -Fluktuationen der untersten Ebene separat untersuchen. Die bei der Untersuchung von Myoglobin gefundene phänomenologische Gleichung für die Korrelationsfunktion

$$\phi(t) = [1 + k(T)t]^{-n} = [1 + t/\tau]^{-n} \quad (2.16)$$

lässt sich verwenden, um mittels Laplace-Transformation eine Ratenverteilung $g(k)$ zu finden

$$\phi(t) = \int_0^\infty dk g(k) \exp(-kt). \quad (2.17)$$

Über $g(E) = g(k)dk/dE$ lässt sich die Ratenverteilung in eine Energiebarrierenverteilung umrechnen. Über diese Rechnung wird die Energiebarrierenverteilung in Gleichung (2.18) berechnet [9]:

$$g(E_A) = \begin{cases} \frac{(\tau/\tau_0)^n}{RT\Gamma(n)} \exp(-nE_A/RT) & E_A < E_A^{\max} \\ 0 & E_A > E_A^{\max} \end{cases} \quad (2.18)$$

$\Gamma(n)$ steht hierin für die Gammafunktion. Der Parameter n gibt das Verhältnis aus Temperatur zur Rauigkeit der Energielandschaft an [92].

Die Peak-Rate der Raten-Verteilung bei der Temperatur T ist dabei gegeben durch $k^{\text{peak}} = nk(T)$ [9] und ihre Temperaturabhängigkeit folgt einem Arrhenius-Gesetz.

Für die betrachteten β -Fluktuationen ist die Energiebarrierenverteilung temperaturunabhängig [9]. Dies ist erfüllt, wenn

$$n = -\frac{RT}{E_a}. \quad (2.19)$$

n muss demnach proportional zur Temperatur verlaufen.

Dieser Ansatz wurde von Austin, Frauenfelder et al. erfolgreich angewendet, um die anomale Dynamik in Myoglobin zu beschreiben. Konkret wurde in den von diesen Autoren durchgeführten Experimenten das Sauerstoffmolekül mittels optischer Anregung von der Hämgruppe getrennt und die Rückbindungsrate bei tiefen Temperaturen über 8 Größenordnungen in der Zeit gemessen [4, 9].

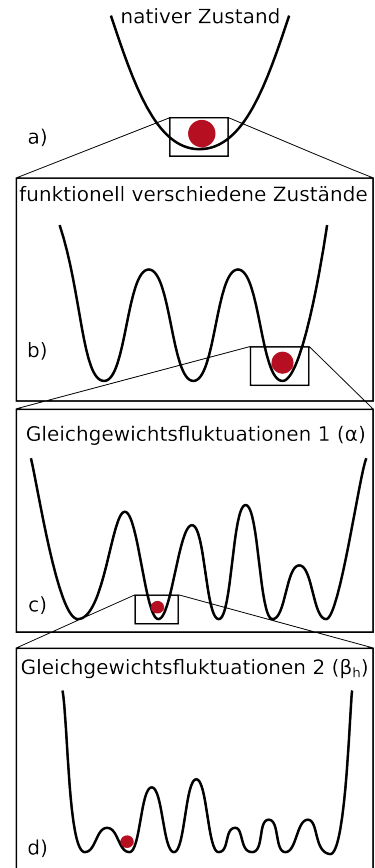


Abb. 2.6: Energielandschaft nach Frauenfelder [79, 81].

Zusammengefasst ergibt sich anomale Dynamik im Energielandschaftsbild, wenn von einer Energiebarrierenverteilung mit einem exponentiellen Schwanz ausgegangen wird. Aus der exponentiellen Energiebarrierenverteilung folgt das subdiffusive, anomale Verhalten.

Das Energielandschaftsbild beruht auf der Beschreibung von Dynamik als aktiviertem Prozess. Es ist daher insbesondere zur Beschreibung von stark unterkühlten Flüssigkeiten anwendbar [36, 93] und eignet sich weniger zur Beschreibung von Glasdynamik bei hohen Temperaturen, wo die Dynamik nicht mehr von aktivierten Sprüngen dominiert wird.

Bei höheren Temperaturen lässt sich die Dynamik besser durch den im folgenden Kapitel näher erläuterten Ansatz der Modenkopplungstheorie beschreiben.

2.2.2 Moden-Kopplungstheorie

Die Modenkopplungstheorie wurde zur Beschreibung von Dynamik unterkühlter Flüssigkeiten entwickelt. In diesem Abschnitt werden die grundlegenden Gedanken skizziert, bevor dann auf die Vorhersagen der Modenkopplungstheorie bezüglich anomaler Dynamik eingegangen wird. Einführende Literatur zur Modenkopplungstheorie findet sich in [143, 182, 218, 289].

Normale Dynamik in der MCT

Die Modenkopplungstheorie trifft Aussagen über die Zeitentwicklung von Korrelationsfunktionen, die an Dichtefluktuationen koppeln [8]. Ausgangspunkt für die Vorhersagen ist der temperaturabhängige, statische Strukturfaktor $S(q)$. Die Änderung des statischen Strukturfaktors beim Glasübergang ist, wie oben erwähnt, sehr klein. Die Kopplung zwischen statischem Strukturfaktor und der Korrelationsfunktion des Systems muss auf stark nichtlineare Art und Weise erfolgen, um die starke Variation der Dynamik in der Nähe des Glasübergangs zu reproduzieren.

Die Grundgleichung der Modenkopplungstheorie beruht auf der Langevin-Gleichung (2.1). Statt eines zufälligen Rauschens werden sogenannte Gedächtnisterme eingeführt und die Bewegungsgleichung wird für einen sogenannten Korrelator, wie z.B. die intermediäre Streufunktion $S(q, t)$ aufgestellt [143]

$$\frac{\partial^2 S(q, t)}{\partial t^2} + \Omega_0^2(q)S(q, t) + \lambda \int_0^t d\tau \left[M^0(q, t - \tau) + \Omega_0^2(q)m(q, t - \tau) \right] \frac{\partial S(q, \tau)}{\partial \tau} = 0. \quad (2.20)$$

Hierin ist λ ein Kopplungsparameter und sind $M^0(q, t)$ und $m(q, t)$ Gedächtnisterme, wobei ersterer die Dynamik bei hohen Temperaturen dominiert, und letzterer die Dynamik im unterkühlten Bereich, $\Omega_0(q)$ ist eine mikroskopische Frequenz, die aus dem Strukturfaktor berechnet werden kann. Es gilt: $\Omega_0^2(q) = q^2 k_B T / (m S(q))$ mit m , der Masse der Teilchen. In die Gedächtnisterme geht der Strukturfaktor ein, hierin steckt

also die systemspezifische Information.

Die Dynamik im System hängt vom Wert des Kontrollparameters ab, dieser kann beispielsweise die Temperatur oder die Dichte des Systems sein. Überschreitet der Kontrollparameter einen kritischen Wert, z.B. T bei T_c , so tritt in der Korrelationsfunktion im Langzeitlimit eine Bifurkation¹¹ auf. In anderen Worten: die Korrelationsfunktion fällt entweder auf Null ab, dann ist das betrachtete System eine Flüssigkeit, oder sie endet auf einem Plateau f_q , dem Nichtergodizitätsparameter, dann befindet sich das System im Glaszustand (vgl. Abb. 2.2(b)). Der Übergang zwischen ergodischem und nichtergodischem Verhalten tritt bei der kritischen Temperatur T_c auf. Die MCT trägt somit der Eigenschaft des Glasübergangs Rechnung, dass dieser ein dynamischer aber kein struktureller Übergang ist.

Die mit der Modenkopplungstheorie beschriebene Dynamik lässt sich näherungsweise im Energielandschaftsbild verstehen. Die Dynamik ist eine Diffusionsdynamik, keine Sprungdynamik. Für $T < T_c$ befindet sich das System in einem Potentialminimum, dieses Minimum kann es nicht verlassen, da es keine Sprünge gibt. Die Korrelationsfunktion verbleibt demnach für $t \rightarrow \infty$ auf einem endlichen Wert. Für $T > T_c$ dagegen besetzt das System bevorzugt Sattelpunkte im Phasenraum und kann zwischen diesen diffundieren [36].

In molekularen Gläsern wurde gefunden, dass die kritische Temperatur T_c oberhalb der Glastemperatur T_g liegt. Um zu erklären, weshalb unterhalb von T_c noch ein ergodisches Verhalten der unterkühlten Flüssigkeit gefunden wird, wurde die sogenannte erweiterte Modenkopplungstheorie vorgeschlagen [84]. Darin werden zuvor vernachlässigte Terme der Moden-Kopplungstheorie berücksichtigt und dadurch eine Möglichkeit geschaffen, durch Phononen ausgelöste Sprungprozesse eines Teilchens aus seinem Käfig heraus mit der MCT zu beschreiben. Diese aktivierten Prozesse sollen es ermöglichen, auch unterhalb von T_c einen Abfall der Korrelationsfunktion auf Null zu erhalten [143]. Allerdings löst die Erweiterung der Modenkopplungstheorie nicht alle Schwierigkeiten der Theorie. Kritik an der Modenkopplungstheorie ist beispielsweise in [21, 238] nachzulesen.

Eine der Stärken der Modenkopplungstheorie besteht darin, dass sie nicht nur das Verhalten der α -Relaxation sondern auch das der β -Relaxation vorhersagt. In der Modenkopplungstheorie werden der frühe und der späte β -Prozess unterschieden. Mit dem frühen β -Prozess wird der Abfall der Korrelationsfunktion hin zum Plateau bezeichnet, der späte β -Prozess bezeichnet den Übergang vom Plateau zur α -Relaxation. Diese Stärke der MCT wird zur Beschreibung anomaler Dynamik genutzt.

Anomale Dynamik in der MCT

In der einfachsten Version der Modenkopplungstheorie erfolgt der Glasübergang, wenn ein Kontrollparameter (Dichte, Temperatur, Wechselwirkungsstärke) einen kritischen

¹¹ Diese wird in der Literatur als A_2 Singularität bezeichnet und "fold"-Singularität genannt.

Wert überschreitet. Der mikroskopische Mechanismus dahinter ist der, dass alle Teilchen im Käfig ihrer Nachbarn gefangen sind. Für Systeme, die von mehr als einem Kontrollparameter abhängen, kann es mehr als einen Mechanismus der kritischen Verlangsamung von Dynamik geben [248]. Diese Vorstellung soll an zwei Beispielen verdeutlicht werden. Das erste Beispiel ist ein System, in dem es neben der Hard-Core-Abstoßung noch einen attraktiven Potentialterm zur Modellierung der intermolekularen Kräfte gibt [241]. Die beiden in diesem System auftretenden Mechanismen des strukturellen Arrests sind zum einen der herkömmliche Glasübergang und zum anderen, dass die Teilchen eine Bindung, die der attraktiven Wechselwirkung genügt, zu allen Nachbarn eingeht [52]. Das zweite Beispiel von zwei verschiedenen Mechanismen des strukturellen Arrests wurde für eine binäre Mischung aus schnellen Teilchen A und langsamen Teilchen B vorgestellt [189]. Einerseits kann die Hard-Core-Abstoßung zu einem Glasübergang führen, andererseits kann ein schnelles Teilchen A von langsamen Teilchen B umgeben sein und dadurch strukturell arretiert werden.

In der Terminologie der Modenkopplungstheorie führen konkurrierende Glasbildungsmechanismen zu Singularitäten höherer Ordnung¹². Eine A_3 -Singularität entsteht als Endpunkt einer Glas-Glas-Übergangslinie [95]. Je nach Szenario befindet sich die Singularität entweder in einem Glas und ist der Endpunkt einer Glas-Glas-Übergangslinie (A_3) oder sie bildet einen Schnittpunkt von zwei Flüssig-Glas-Übergangslinien (A_4 , gestrichelte Linie in Abb. 2.7) [248].

Die Lösung der Modenkopplungsgleichung führt in der Nähe einer Singularität höherer Ordnung zu einem näherungsweise logarithmischen Abfall in den Korrelationsfunktionen. Die Lösung der MCT-Grundgleichung (2.20) lautet dann [96]:

$$S(q, t) \propto \left[f_q - H'_q \ln(t/\tau_\beta) + H''_q \ln^2(t/\tau_\beta) \right]. \quad (2.21)$$

Nach Götze et al. [96] bieten sich drei Interpretationsmöglichkeiten solcher logarithmischen Gesetze an: (1) der logarithmische Abfall kann den Bereich des strukturellen Abfalls beschreiben, (2) der logarithmische Abfall beschreibt nur den Beginn und den mittleren Teil der α -Relaxation, wodurch diese stark gestreckt wird, der β -Abfall jedoch reduziert wird und (3) der logarithmische Abfall gilt nur im Bereich des β -Prozesses, wodurch dieser ausgedehnt und gestreckter wird. An das logarithmische Gesetz schließt sich dann noch ein exponentieller Abfall an.

Die dritte Interpretation wurde von Lagi et al. zur Analyse von Korrelationsfunktionen des Proteins Lysozym eingesetzt [156]. Wir folgen Lagi et al. und beschränken uns auf die letzte Interpretationsmöglichkeit. Zur Beschreibung von zeitabhängigen Korrelationsfunktionen im gesamten Zeitbereich kann demnach folgende Gleichung verwendet werden:

$$\Phi(t) \propto \left[f_q - H'_q \ln(t/\tau_\beta) + H''_q \ln^2(t/\tau_\beta) \right] \exp(-t/\tau_\alpha). \quad (2.22)$$

¹² A_3 und A_4 in der Nomenklatur von Arnold. Sie sind wie eine Zacke (cusp) bzw. wie ein Schwalbenschwanz (swallowtail) geformt.

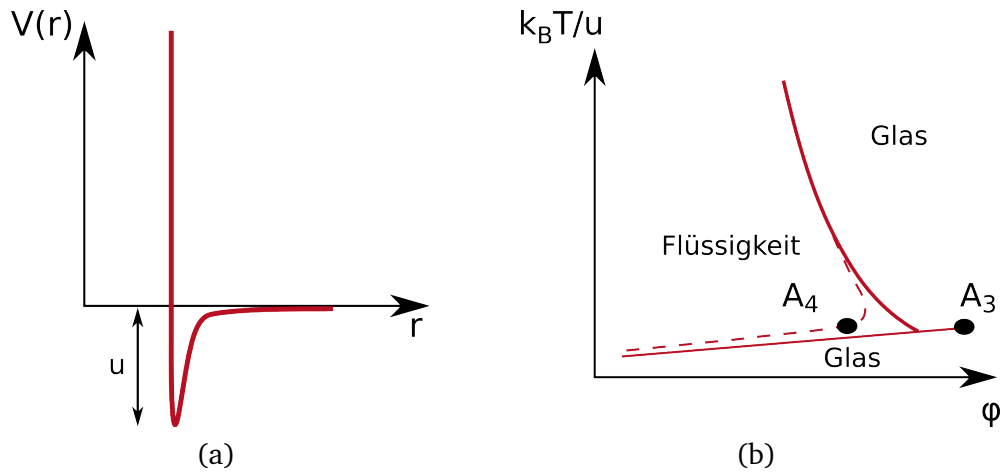


Abb. 2.7: a) „Sticky hard sphere“-Potential als Beispiel eines Potentials mit anziehendem Term, für das es zwei Mechanismen des Glasübergangs gibt. b) Phasendiagramm eines solchen Systems nach [71, 241]. Aufgetragen sind die Phasengrenzlinien als Funktion der relativen thermischen Energie $k_B T/u$ und der Packungsdichte ϕ . Die untere gerade Linie markiert den Flüssig-Glas-Übergang aufgrund der kurzreichweitigen Anziehung [71]. Die nahezu senkrechte, gebogene Linie beschreibt den Flüssigkeits-Glas-Übergang aufgrund des abstoßenden Potentialterms.

Der Verlauf der Korrelationsfunktion wird durch die kritischen Amplituden $H'(q)$ und $H''(q)$ bestimmt. Für $H''(q) = 0$ ergibt sich ein rein logarithmischer Abfall. Dagegen wechselt die Krümmung der Korrelationsfunktion von konkav nach konvex für $H''(q) > 0$ bzw. $H''(q) < 0$.

Für Kolloide erscheint diese Betrachtungsweise einleuchtend. Bisher gibt es in der Literatur jedoch keinen Vorschlag, welche anziehende Wechselwirkung bei Proteinen wirken könnte.

Dieser spezielle Fall der Modenkopplungstheorie wurde von Lagi et al. [156] zur Analyse von MD-Simulationen von Lysozym gewählt und sie ist Ausgangspunkt für die in Kap. 5.1.1 beschriebene Analyse von MD-Daten von Elastin und Myoglobin.

2.2.3 Fraktionaler Fokker-Planck-Ansatz

Subdiffusion entsteht, wenn eine Verteilung von Sprungzeiten¹³ oder von Sprunglängen vorliegt und diese Verteilung einen divergierenden Mittelwert aufweist. Für diese Situationen gibt es zwei mikroskopische Ursachen [46]: Eine divergierende Sprungzeitenverteilung kann dadurch hervorgerufen werden, dass ein Teilchen an einer Position gefangen wird (z.B. durch Wasserstoffbrückenbindungen) und divergierende Weglän-

¹³ Das entspräche im einfachsten Fall der Energiebarrierenverteilung.

gen durch Diffusion in Fraktalen¹⁴. Die folgende Argumentation stützt sich nach [184] auf eine divergierende Wartezeitenverteilung.

Die wesentliche Gleichung zur Beschreibung von Subdiffusion ist die fraktionale Diffusionsgleichung (FDE), die einer Verallgemeinerung des 2. Fick'schen Gesetzes (s. Gl. (2.5)) (hier in 1D mit $r^2 = x^2 + y^2 + z^2$) entspricht

$$\frac{\partial p(x, t)}{\partial t} = {}_0D_t^{1-\alpha} K_\alpha \frac{\partial^2 p(x, t)}{\partial x^2}. \quad (2.23)$$

K_α ist hierin der verallgemeinerte Diffusionskoeffizient und ${}_0D_t^{1-\alpha}$ ist der Riemann-Liouville-Operator¹⁵, der zur Beschreibung von fraktionalen Ableitungen verwendet wird [183]. Die fraktionale Diffusionsgleichung kann gelöst werden, indem sie Laplace-transformiert, nach Taylor entwickelt und dann für die einzelnen Terme, auch Moden genannt, gelöst wird. Eine genauere Beschreibung der mathematischen Grundlagen ist in [184] enthalten. Jede Mode der fraktionalen Diffusionsgleichung zerfällt gemäß einer Mittag-Leffler-Funktion E_α :

$$p(k, t) = E_\alpha(-K_\alpha k^2 t^\alpha) \quad \text{mit} \quad E_\alpha \left[-\left(\frac{t}{\tau}\right)^\alpha \right] = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{[-(t/\tau)^\alpha]^n}{n!} \Gamma(1 + \alpha n) \quad (2.24)$$

Subdiffusion entsteht für $\alpha < 1$. Die Fouriertransformierte der Relaxationsfunktion ist die Cole-Cole-Funktion [92].

Die Mittag-Leffler-Funktion zeigt im Grenzfall langer Zeiten ein Potenzgesetzverhalten:

$$p(k, t) \propto \frac{1}{K_\alpha k^2 t^\alpha \Gamma(1 - \alpha)} \quad (2.25)$$

Zur Beschreibung der Bewegung von Proteinen wird nun angenommen, dass sich ein Teilchen in einer komplexen Energielandschaft bewegt. Zusätzlich zur Wartezeitenverteilung liegt demnach ein externes Potential vor. Statt der fraktionalen Diffusionsgleichung, die kein externes Feld berücksichtigt, wird nun die fraktionale Fokker-Planck-Gleichung herangezogen

$$\frac{\partial p(x, t)}{\partial t} = {}_0D_t^{1-\alpha} \left[\frac{\partial}{\partial x} \frac{V(x)}{m\xi} + K_\alpha \frac{\partial^2}{\partial x^2} \right] p(x, t). \quad (2.26)$$

Der analytisch lösbare Spezialfall eines harmonischen Potentials $V(x) = \frac{1}{2}m\omega^2 x^2$ wird fraktionaler Ornstein-Uhlenbeck-Prozess genannt. Dieser Prozess beschreibt die Diffusion in einer rauen Energielandschaft mit harmonischem Gesamtpotential. Eine

¹⁴ In der Anwendung auf Proteine wird dies auf zweierlei Arten interpretiert: das Protein stellt einerseits selbst ein statisches Fraktal dar [69], und andererseits wird der Konfigurationsraum des Proteins als fraktale Struktur beschrieben [191].

¹⁵ Er ist definiert als: ${}_0D_t^{1-\alpha} = \frac{1}{\Gamma(1-\alpha)} \frac{d}{dx} \int_0^t \frac{f(t-t')}{(t-t')^\alpha} dt'$.

Veranschaulichung dieses Potentials zeigt das Inset der Abbildung 2.1(b). Er wurde erstmals von Glöckle und Nonnenmacher [92] zur Interpretation der Dynamik in Myoglobin angewandt und ist seither in einer Vielzahl von Studien zum Einsatz gekommen [12, 142, 146, 183].

Der fraktionale Ornstein-Uhlenbeck-Prozess sagt für das mittlere Verschiebungsquadrat in einer Dimension $\langle x(t) \rangle$ voraus [142]:

$$\langle x(t) \rangle = \langle x_0 \rangle \left(1 - E_\alpha \left[\left(-\frac{t}{\tau} \right)^\alpha \right] \right). \quad (2.27)$$

$\langle x_0 \rangle$ bezeichnet hierin die mittlere quadratische Positionsfluktuation. Für die intermediäre inkohärente Streufunktion gilt [142]:

$$S(q, t) = \exp \left(-q^2 \langle x^2 \rangle \right) \sum_{n=0}^{\infty} \frac{q^{2n} \langle x^2 \rangle^n}{n!} E_\alpha \left[-n \left(\frac{t}{\tau} \right)^\alpha \right]. \quad (2.28)$$

Wesentlich zur Unterscheidung der verschiedenen Modelle für Subdiffusion ist, welche Temperaturabhängigkeit für den Exponenten α vorhergesagt wird. Im Fall des fraktionalen Ornstein-Uhlenbeck-Prozesses wird ein temperaturunabhängiger Exponent erwartet [98]. Diese Vorhersage wird in Kapitel 5.1.1 anhand der MD-Simulationen an Elastin und Myoglobin überprüft.

Im Gegensatz dazu folgt aus der Herleitung der Subdiffusion mittels einer generalisierte Langevingleichung die Vorhersage eines temperaturabhängigen Exponenten α [98]. Welcher dieser Ansätze zur Beschreibung von Proteindynamik besser geeignet ist, ist Bestandteil aktueller Diskussion [98, 146, 185, 206].

2.3 Dynamischer Übergang

In hydratisierten Proteinen wird experimentell bei ca. $T \approx 200 \text{ K}$ das Einsetzen eines dynamischen Prozesses beobachtet. Dieses Phänomen, der sogenannte dynamische Übergang, soll in diesem Kapitel vorgestellt werden. Der Abschnitt gliedert sich in zwei Unterkapitel. Zunächst sollen die Beobachtungen zusammengetragen werden und schließlich die verschiedenen Interpretationsansätze dargelegt werden. Einen guten Überblick mit vielen Literaturquellen geben Daniel et al. in einem Review-Artikel [49]

2.3.1 Experimentelle Befunde zum dynamischen Übergang

Beim dynamischen Übergang spielen die Dynamik des Proteins und des umgebenden Lösemittels, meist Wasser, eine Rolle. In diesem Abschnitt werden zunächst die experimentellen Befunde zur Proteindynamik vorgestellt, bevor auf die Dynamik von Wasser an Proteinoberflächen eingegangen wird.

Proteindynamik

Mit Neutronenstreuung kann das mittlere Verschiebungsquadrat der Proteinprotonen als Funktion der Temperatur bestimmt werden und somit ein Überblick über die interne Proteindynamik erhalten werden. Das mittlere Verschiebungsquadrat steigt für tiefe Temperaturen linear an. Dies entspricht einer Bewegung der Protonen in einem harmonischen Potential. Bei Temperaturen von ca. 180-240 K wird für hydratisierte Proteine eine Abweichung von diesem linearen Anstieg, das Einsetzen einer anharmonischen Dynamik, beobachtet. Das MSD steigt stärker an. Dieser Anstieg wird als dynamischer Übergang bezeichnet. Beispieldaten aus der Arbeit von Roh et al. für Lysozym sind in Abb. 2.8(a) dargestellt.

Der dynamische Übergang wurde seit seiner ersten Beschreibung von Doster [62] inzwischen in vielen verschiedenen, hydratisierten Proteinen gemessen [45, 60, 152, 215] und ist heute als charakteristische Eigenschaft von Proteinen allgemein akzeptiert [32, 220]. Er ist nur in der linearen Auftragung des MSD als Funktion der Temperatur zu erkennen, wie das Inset in Abbildung 2.8(a) zeigt [59, 74]. Nach Doster [58, 59] ist der Begriff dynamischer Übergang für einen dynamischen Prozess dann anwendbar, wenn entweder die Amplitude eine exponentielle Temperaturabhängigkeit oder die Zeitskala einer Super-Arrhenius-Temperaturabhängigkeit aufweist. Welche mikroskopische Ursache dem dynamischen Übergang in Proteinen zu Grunde liegt, ist jedoch noch umstritten [136, 284].

In Übereinstimmung mit den Messungen des mittleren Verschiebungsquadrats mit Neutronenstreuung wurden Hinweise auf den dynamischen Übergang auch in anderen Techniken gefunden, z.B. in der Mößbauer-Spektroskopie [79], der NMR-Spektroskopie [158] und mit Infrarot-Vibrations-Echo-Spektroskopie [216].

Kennzeichnend für den dynamischen Übergang ist die Abhängigkeit vom Hydrationswasser. So bleibt der Anstieg in trockenem Protein linear mit der Temperatur [45, 153, 222] und es ist kein dynamischer Übergang zu sehen. Mit steigendem Hydrationsgrad dagegen nimmt die Amplitude des überlinearen Anstiegs zu (vgl. Abb. 2.8(a)) [153, 160, 202, 221]. Für eine Abhängigkeit des dynamischen Übergangs vom Wasser spricht darüber hinaus, dass auch die völlig anders strukturierten Biomakromoleküle DNA und RNA den dynamischen Übergang aufweisen [32, 246].

Bei der Untersuchung der Rolle des Wassers wurde vielfach den Fluktuationen der Wasserstoffbrückenbindungen eine tragende Rolle in der Protein-Wasser-Interaktion zugesprochen [122, 204, 253, 254]. Die Abhängigkeit der Proteindynamik von der Wasserdynamik wird als sehr stark angesehen [73, 74, 78, 79].

Der Einfluss des Lösemittels wurde in anderen Arbeiten untersucht. Während Wasser den beschriebenen Weichmachereffekt auf das Protein hat, wirken Polyole und Zucker als Stabilisatoren, die die Struktur verstärken und die Mobilität des Proteins verringern [203]. Beispielhaft ist das MSD für Lysozym in verschiedenen Lösemitteln aus

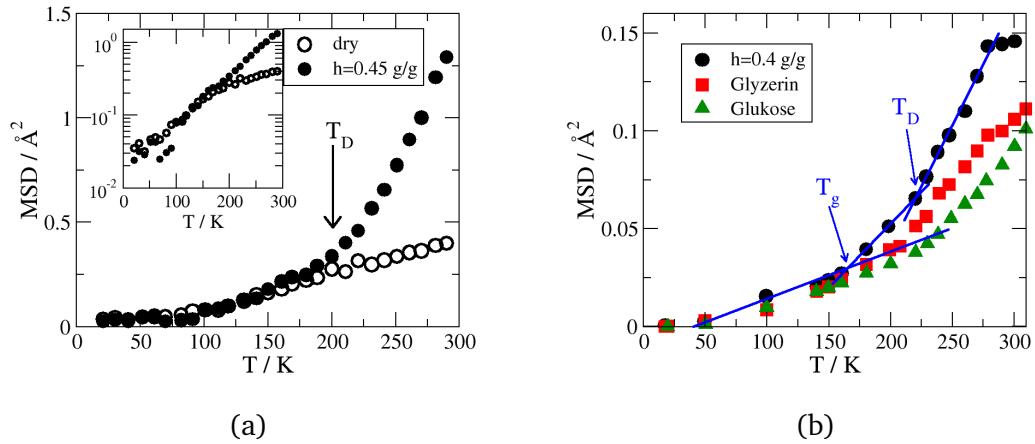


Abb. 2.8: a) Dynamischer Übergang in Lysozym nach Roh et al. [221], für die trockene Probe ist lediglich ein linearer Anstieg im gesamten Temperaturbereich zu erkennen. Die hydratisierte Probe weist einen stärkeren Anstieg ab $T = 200$ K auf. Inset: logarithmische Darstellung derselben Daten. b) Abhängigkeit des dynamischen Übergangs in Lysozym vom Lösemittel [34, 203]. Mit steigender Viskosität nimmt die Temperatur des dynamischen Übergangs T_D zu. Die blauen Geraden verdeutlichen die Interpretation des Einsetzens der Proteindynamik als zweistufigen Prozess gemäß Capaccioli [34]. Zu beachten ist, dass sich die Werte des mittleren Verschiebungsquadrats für das gleiche Protein (Lysozym) zwischen den beiden Publikationen auswertungsbedingt um eine Größenordnung unterscheiden (vgl. Fußnote 16).

der Arbeit von Paciaroni et al. in Abb. 2.8(b) gezeigt¹⁶. Der Effekt von Stabilisatoren wurde z.B. in Wasser-Glyzerin-Mischungen untersucht [195, 203, 254, 261]. Je höher der Glyzerinanteil im Lösemittel, desto geringer die Abweichung vom linearen MSD. Zudem verschiebt sich die Temperatur des dynamischen Übergangs in Proteinen als Funktion vom Glukosegehalt des Lösemittels zu höheren Werten [47, 261].

Die enzymatische Aktivität verschiedener Proteine als Funktion der Temperatur zeigt für einige Proteine ein Einsetzen von Funktion bei der Temperatur des dynamischen Übergangs T_D . Dadurch wurde der dynamische Übergang mit dem Einsetzen von Proteinfunktion in Verbindung gebracht [75, 163, 215] und der zusätzliche dynamische Prozess als funktionell relevant eingestuft. Ein erstaunliches Ergebnis ergab die Arbeit von Gallat et al. [90]. Die Autoren konnten demonstrieren, dass niedermolekulare Lösemittel keine zwingende Voraussetzung für das Einsetzen der Proteinfunktion sind, sondern dass eine Korona aus flexiblen Polymerketten um ein Protein herum ausreicht, um funktionelle Dynamik des Proteins zu ermöglichen [90].

¹⁶ Beim Vergleich der absoluten Werte des MSD mit den Werten in Abb. 2.8(a) fällt auf, dass sich die Daten von Roh und von Paciaroni um eine Größenordnung unterscheiden. Dies ist auf unterschiedliche Auswertemethoden zurückzuführen. Während Roh et al. auf die isotrope Gaußnäherung zurückgreifen, verwenden Paciaroni et al. ein Zweiplatzsprung-Modell zur Evaluierung des MSD.

Ein weiterer experimenteller Befund zum dynamischen Übergang betrifft die Abhängigkeit der Übergangstemperatur von der Zeitskala des Experiments. So wird in einigen Arbeiten gefunden, dass die Temperatur des dynamischen Übergangs umso höher ist, je kürzer die Zeitskala des Experiments ist [15,34,49,136,177]. Diese Beobachtung stellt die Verknüpfung von Funktion und dynamischem Übergang in Frage, da die Funktion unabhängig von der Zeitskala des Experiments einsetzt [15].

Auf der Suche nach dem Ursprung des dynamischen Übergangs wurden verschiedene Beiträge identifiziert, die zur Streuung in Proteinen und somit zum mittleren Verschiebungsquadrat beitragen. Dazu zählen einerseits die Methylgruppen. Diese führen wie bereits erwähnt (vgl. Kap. 2.1.3) eine schnelle Rotationsbewegung aus und verursachen eine Abweichung vom linearen Tieftemperaturverhalten für $T > 150\text{ K}$ [222, 256]. Der Methylgruppenbeitrag kann den dynamischen Übergang überlagern [59].

Der dynamische Übergang wird nach Schiro et al. [234] von einer erhöhten Rückgratmobilität verursacht. Diesen Schluss zogen sie aus vergleichenden Neutronenstreuexperimenten an Homopeptiden mit und ohne Methylgruppen, die beide den dynamischen Übergang aufweisen.

In den letzten Jahren wurden mittels verbesserter Spektrometer und Datenauswertung von mehreren Gruppen zwei Komponenten des dynamischen Übergangs gefunden [34, 60]. Diese Interpretation ist in Abbildung 2.8(b) durch die blauen Geraden verdeutlicht [34]. Die erste Stufe bei niedrigerer Temperatur wird mit dem Glasübergang des Systems, bzw. des Wassers in Verbindung gebracht. Sie ist von der Zeitskala des Experiments unabhängig. Die zweite Stufe entspricht dagegen jener, die auch in den anderen Experimenten gefunden wurde und die oben beschriebenen Abhängigkeiten vom Hydratationsgrad, Lösemittel und der Zeitskala des Experiments aufweist.

Der dynamische Übergang wurde meist anhand des mittleren Verschiebungsquadrats aus Neutronenstreuung identifiziert und weiter ausgewertet. Die Größenordnung der beteiligten atomaren Bewegungen lässt sich aus dem MSD ablesen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass unterschiedliche Auswertungen (harmonische Näherung, Zweiplatzsprung-Modell) Unterschiede von über einer Größenordnung ergeben (vgl. z.B. [153] und [177]). Des Weiteren ist zu beachten, dass Methylgruppen q -unabhängige Beiträge zur elastischen Streuung geben, die Auswertung des MSD aus Neutronenstreudaten jedoch um diesen Beitrag meist nicht korrigiert wurden. Die Vergleichbarkeit des mittleren Verschiebungsquadrats aus Neutronenstreuung mit MD-Simulationen ist deshalb nur eingeschränkt möglich.

Experimentelle Befunde zur Dynamik des Proteinhydratationswassers und Zusammenspiel mit Proteindynamik

Wie im vorigen Abschnitt anhand der Befunde zum dynamischen Übergang zu sehen, spielt das Lösemittel, in vivo also das Wasser eine große Rolle für die Proteindyna-

mik [28, 42]. Wasser wechselwirkt auf verschiedene Arten mit dem Protein. Es füllt die Hohlräume in seinem Inneren, bildet eine Schicht um das Protein, die Hydrathülle, und beeinflusst das Protein als Bulksolvanz [245].

Wasser, das sich in der Hydrathülle eines Proteins befindet, weist einige Anomalien auf, die gegenwärtig erforscht werden. Zum Beispiel kristallisieren die ersten zwei Hydratwasser-Monolagen nicht, sondern zeigen möglicherweise einen Glasübergang [243, 252]. Darüber hinaus ist die Translations- und Rotationsdynamik des Hydratwassers im Vergleich zu Bulk-Wasser verlangsamt [10] und die Ausdehnung und das Verhalten des Wasserstoffbrückennetzwerks weichen vom bekannten Verhalten ab [31, 122, 211].

Über die Grenzflächen zwischen Protein und Wasser findet eine Kopplung von Wasserdynamik und Proteindynamik statt. Für den Mechanismus dieser Kopplung werden unterschiedliche Modelle diskutiert: Vorgeschlagen wurde zum einen, dass das Wasser, wie ein Weichmacher in Polymeren, aufgrund seiner hohen Permittivität die Ladungen der Proteinseitenketten abschirmt und somit die Seitenketten besser aneinander vorbeigleiten können [42] und zum anderen, dass Fluktuationen des Bulk- und Hydratationswassers Konformationsänderungen im Protein anstoßen [59, 73, 235].

Auch Untersuchungen mit ^{13}C -NMR-Spektroskopie lieferten wichtige Diskussionsbeiträge zur Frage nach der Kopplung von Protein und Hydratationswasser. So konnte in Messungen der Proteindynamik in Abhängigkeit vom Hydratationsgrad eine Erhöhung der Bewegungsamplitude ab dem Vorliegen von einer Monolage Hydratwasser nachgewiesen werden [210, 217]. Weitere Hinweise auf den Kopplungsmechanismus ergaben die Molekulardynamik-Simulationen von Tarek und Tobias, die zeigten, dass das Wasserstoffbrückennetzwerk des Hydratwassers eine wichtige Rolle spielt [254]. Im Detail ist jedoch noch unklar, welche Relaxationsprozesse entscheidend für dieses Zusammenspiel sind und welchen Beitrag das Wasser zum dynamischen Übergang liefert.

Die verschiedenen Interpretationsansätze in Bezug auf den dynamischen Übergang werden im folgenden Abschnitt vorgestellt.

2.3.2 Interpretationsansätze

Der dynamische Übergang ist durch ein Einsetzen von Flexibilität und Mobilität des Proteins oberhalb der Temperatur T_D charakterisiert. Diese Temperatur ist vom Lösemittel, vom Hydratationsgrad und von der Zeitskala des Instruments abhängig. Umstritten ist jedoch, welche mikroskopischen Prozesse für den dynamischen Übergang verantwortlich sind. Zur Erklärung werden unterschiedliche Interpretationen verwendet, die sich aus verschiedener Verwendung von Begriffen und Konzepten und teilweise durch Unterschiede in der Datenauswertung ergeben. Zu nennen sind insbesondere die Ansätze von Frauenfelder, Doster, Ngai und Chen.

Deutung des dynamischen Übergangs nach Frauenfelder

Frauenfelder entwickelte das oben vorgestellte Energielandschaftsmodell für Proteine [81]. Hierin entspricht die strukturelle Relaxation einem Übergang zwischen Energieminima der ersten Hierarchieebene (Gleichgewichtsfluktuationen 1, vgl. Abb. 2.6), und die sekundäre β_h -Relaxation einer Bewegung in der rauen Energielandschaft der untersten Hierarchieebene (Gleichgewichtsfluktuationen 2) [74].

Das Wasser führt gemäß Frauenfelder zwei dynamische Prozesse mit unterschiedlichen Temperaturabhängigkeiten aus. Einen lokalen Oberflächenprozess mit Arrhenius-Temperaturabhängigkeit und einen diffusiven Bulkprozess mit Vogel-Fulcher-Temperaturabhängigkeit. Frauenfelder et al. prägten das einprägsame Bild der Versklavung der Proteindynamik durch die Wasserdynamik ('Slaving-concept') [73, 74, 78, 79]. Das Bild besagt, dass die Temperaturabhängigkeit der Proteindynamik jener des Wassers folgt, da das mobile Wasser die Bewegungen des trägeren Proteins anstößt.

In diesem Bild stößt der Bulkprozess des Wassers großamplitudige Konformationsänderung im Protein an, z.B. den Wechsel zwischen funktionell verschiedenen Konformationen eines Proteins (vgl. Abb. 2.6 (b)) [74]. Der α -Prozess des Proteins kann nach Fenimore et al. nur dann stattfinden kann, wenn ausreichend Hydratationswasser vorhanden ist ($h > 0.3 \text{ g/g}$ [74]).

Die Proteinfluktuationen, die für den dynamischen Übergang verantwortlich sind, führen Fenimore et al. [74] auf den β_H -Prozess des Proteins zurück. Im Versklavungsmodell koppeln die β_h -Fluktuationen an den Oberflächenprozess des Wassers. Der dynamische Übergang erscheint nach diesem Bild als Anstieg im mittleren Verschiebungsquadrat, wenn die Proteinfluktuationen in das Messfenster des Neutronenstreuexperiments [39], bzw. des Mößbauerexperiments [79] eintreten.

Die Argumentation für die Kopplung der Proteinfluktuationen an die Dynamik des Oberflächen-Hydratationswasser wird wie folgt geführt: Mittels dielektrischer Spektroskopie wird die Ratenverteilung und die Temperaturabhängigkeit des von Frauenfelder „ β -Prozess“ genannten dynamischen Prozesses des Hydratationswassers bestimmt¹⁷. Nun wird aus dieser Verteilungen der Anteil $A(T)$ bestimmt, dessen Korrelationszeit schneller als die Zeitskala des Mößbauer- bzw. Neutronenstreuexperiments ist. Dieser Anteil wird nun passend skaliert und gemeinsam mit dem mittleren Verschiebungsquadrat temperaturabhängig aufgetragen. Es wird ein paralleler Anstieg des MSD des Proteins und des Anteils $A(T)$ der Wasserratenverteilung gefunden [39, 79].

¹⁷ Die Ratenverteilung des Oberflächenwassers werden aus dielektrischen Spektroskopiemessungen an einem System aus hydratisiertem Myoglobin in einer festen Matrix aus Polyvinylalkohol extrahiert. Durch die Verwendung des Polyvinylalkohols ist nach Frauenfelder der α -Prozess des Hydratationswassers unterdrückt und der β -Prozess kann isoliert gemessen werden.

Die Interpretation von Frauenfelder spricht demnach gegen einen dynamischen Übergang im Sinne Dosters, da der Anstieg des mittleren Verschiebungsquadrats nicht von einer Vogel-Fulcher-Temperaturabhängigkeit der Raten begleitet ist.

Deutung des dynamischen Übergangs nach Doster

Doster et al. verwendeten den Begriff „dynamischer Übergangs“ in der Literatur als erste Autoren, für den Anstieg des MSD bei T_D in Myoglobin [62].

In neueren Arbeiten findet Doster zwei Anstiege im mittleren Verschiebungsquadrat [58, 60, 64]. Der bei niedrigerer Temperatur ($T \approx 180$ K) auftretende Knick des mittleren Verschiebungsquadrats ist unabhängig von der Auflösungszeit $\Delta\tau$ des Experiments und tritt nahe der als Glasübergangstemperatur T_g des Hydratationswassers interpretierten Temperatur auf [62]. Der zweite Knick hängt von der Zeitskala des Experiments und von der Oberflächenviskosität des Lösemittels ab [59, 65] und ist somit mit dem α -Prozess des Lösemittels verbunden.

Die Kopplung von Lösemittel an Proteindynamik erfolgt in seinem Bild über das Protein-Wasser-Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk. Die Eigenschaften der Wasserdynamik (z.B. die Temperaturabhängigkeit) lassen sich so auf das Protein übertragen. Oberhalb von T_g erhöht sich die Amplitude der Fluktuation der Wasserstoffbrückenbindungen (β -Prozess) stark [60]. Daraus resultiert eine größere Elastizität für das Protein und folglich wird im MSD der erste Anstieg beobachtet. Diese starke Zunahme der Relaxationsstärke der β -Relaxation bei T_g ist typisch für glasbildende Systeme [23]. Die kleine Stufe kann durch Methylgruppenbewegungen überlagert sein und kann schwer zu detektieren sein [60].

Die Temperaturabhängigkeit des α -Prozesses des Lösemittels folgt nach Doster einem Vogel-Fulcher-Gesetz (s. Gl. (2.8)) [58]. Die Proteindynamik koppelt an die Oberflächenviskosität des Proteins. Die Oberflächenviskosität η kann durch gegenseitige Beeinflussung von Protein und Hydratwasser (und nicht einseitig durch Versklavung) von der Viskosität des Bulks abweichen. Proportional dazu ändern sich die Fluktuationen des Wasser-Protein-Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerks und sie stoßen im Protein kleinamplitudige Librationsbewegungen an [65]. Diese kleinamplitudigen Proteinbewegungen werden mit Neutronenstreuung detektiert, wenn sie bei weiterer Erwärmung in das Zeitfenster der Methode kommen. Der wasserinduzierte, kleinamplitudige Librationsprozess insbesondere von Proteinseitenketten [58] und Diederwinkeln [64] wird von Doster als Ursache des dynamischer Übergang bei T_D angesehen.

Im Unterschied zu Frauenfelder findet Doster folglich einen dynamischen Übergang, der der oben aufgeführten Definition gerecht wird. Die Interpretation von Doster ist in Einklang mit der Moden-Kopplungstheorie (s. Kap. 2.2.2) [34, 59, 60].

Deutung des dynamischen Übergangs nach Ngai

Auch die Autoren Ngai et al. finden zwei Stufen in der Temperaturabhängigkeit des mittleren Verschiebungsquadrats [34, 195].

Der erste Knick wird mit einer Amplitudenänderung der Proteindynamik bei der Glasübergangstemperatur des Lösemittels gleichgesetzt. Diese Interpretation unterscheidet sich von der Dosters darin, dass nicht die Wasserstoffbrückenbindungen als Ursache der erhöhten Amplitude angesehen werden. Stattdessen wird der Anstieg des MSD auf die Änderung von Volumen und Entropie beim Glasübergang zurückgeführt, wie sie auch in konventionellen Glasbildnern beobachtet wird [34, 194]. Ngai et al. nehmen an, dass die Dynamik in der Frequenzdomäne bei diesen Temperaturen von einem sogenannten „nearly constant loss“ (NCL) mit $\chi \propto \omega^{-\alpha}$ und $\alpha < 1$ dominiert wird. Dieser Prozess ist zeitskalenunabhängig und führt zu einem Potenzgesetzabfall der intermediären Streufunktion für kurze Zeiten. Bei T_g ändern sich Relaxationsstärke und dielektrische Stärke dieses Prozesses und führen zu dem Anstieg im mittleren Verschiebungsquadrat. Bei längeren Zeiten wird der Prozess nach Ngai et al. vom Einsetzen des Johari-Goldstein- β -Prozess abgeschnitten [34].

Der Johari-Goldstein- β -Prozess besitzt im Gegensatz zum NCL eine charakteristische Zeitskala, die sich mit der Temperatur ändert [195]. Er ist ein Vorläuferprozess der strukturellen Relaxation, der mit dieser bei höherer Temperatur verschmilzt [35]. Wenn dieser Prozess, der an die Proteindynamik koppelt [34], ins Zeitfenster der Methode kommt, ist im Bild von Ngai der dynamische Übergang zu beobachten [34, 195]. Auch Ngai et al. finden, dass der erste Knick bei T_g insbesondere in höher hydratisierten Systemen schwierig zu detektieren sein kann, führen dies jedoch im Gegensatz zu Doster auf die geringe Fragilität¹⁸ des Hydratationswassers bei großen Hydratationsgraden zurück [34].

Das von Ngai für den dynamischen Übergang vorgeschlagene Modell steht im Einklang mit dem von ihm entwickelten Kopplungsmodell [193].

Deutung des dynamischen Übergangs nach Chen

Eine weitere Interpretation des dynamischen Übergangs wurde von Chen et al. vorgeschlagen. Diese Interpretation gilt ausschließlich für Wasser als Lösemittel. Auch im Ansatz von Chen et al. wird von einer starken Kopplung zwischen Wasserdynamik und Proteindynamik ausgegangen. Bei T_D kommt es nach Chen et al. zu einer Änderung der Proteindynamik, da das Hydratationswasser bei dieser Temperatur einen Fragil-Stark-Übergang (engl. fragile strong transition (FST)) hat [40, 152, 179, 181].

Der Fragil-Stark-Übergang des Wassers geht einher mit einem strukturellen Übergang zwischen einer niedrigdichten Wasserphase (meist vierfach-koordiniertes Wasser) bei tiefen Temperaturen zu einer hochdichten Phase (häufiger fünffach koordiniertes Wasser) des Wassers bei höheren Temperaturen. Dieser Übergang wurde von Poole et al.

¹⁸ definiert als die Änderung der Steigung $m = d \log \tau_\alpha / d(T_g/T)$ bei T_g [195]

vorgeschlagen [213], um die Anomalien des Wassers zu erklären¹⁹. In Bulkwasser ist der Temperaturbereich (150-235 K) in dem dieser Übergang zu finden sein könnte, jedoch durch die Kristallisationsneigung von Wasser experimentell nicht zugänglich („No-mans-Land“) [188].

Die Arbeitsgruppe um Chen untersucht die Eigenschaften des Wassers daher in räumlicher Einschränkung (Confinement), wie z.B. in Poren, oder an der Oberfläche von Proteinen und hat dabei in verschiedenen Systemen und mit verschiedenen Methoden einen Fragil-Stark-Übergang identifiziert [40,72,169,179]. Auch MD-Simulationen der Gruppe um Stanley [152] finden bei der Temperatur des dynamischen Übergangs Hinweise, die im Einklang mit einem Flüssig-Flüssig-Kritischen Punkt stehen.

Von Chen et al. wurde nun vorgeschlagen, dass diese Änderung der Wasserdynamik ausschlaggebend für den Anstieg im mittleren Verschiebungsquadrat der Proteine ist [236]. Das Szenario von Chen et al. ist also ein einstufiges Modell.

Vergleich der Ansätze

In den vorangegangenen Abschnitten wurden mehrere Interpretationsansätze zum dynamischen Übergang vorgestellt. Alle Interpretationen stimmen darin überein, dass bei T_D das Protein flexibler wird. Alle vier Erklärungsansätze sehen einen dynamischen Onset bei T_D , der von der Auflösungsfunktion des Spektrometers abhängig ist, dieser wird als dynamischer Übergang bezeichnet. Gemeinsam ist allen vier Ansätzen weiterhin, dass sie versuchen durch Auswertung der Wasserdynamik dem Übergang auf die Spur zu kommen.

Sie unterscheiden sich jedoch darin, ob die Abweichung der Proteindynamik vom harmonischen Verhalten in ein oder zwei Stufen erfolgt und was die Ursache der Anharmonizität ist. Die vier Ansätze sind in Tabelle 2.1 gegenüber gestellt. Diese Darstellung ist verkürzt und vereinfacht und soll lediglich dabei helfen die Modelle voneinander zu unterscheiden.

Doster und Ngai finden zwei Stufen in der Temperaturabhängigkeit des MSD. Sie identifizieren die erste Stufe des dynamischen Übergangs als mit dem Glasübergang $T_g > T_D$ [34] des Protein-Wasser-Systems assoziiert. Eine solche Stufe im mittleren Verschiebungsquadrat bei T_g ist aus glasbildenden Systemen bekannt [83, 194]. Diese Stufe wird in den Erklärungen von Chen und Frauenfelder nicht beobachtet.

¹⁹ So ist es bislang beispielsweise unklar, weshalb Wasser ein Dichtemaximum bei $T = 4\text{ K}$ aufweist. Im von Poole vorgeschlagenen liquid-liquid-critical-point-Szenario (LLCP) für Wasser wird davon ausgegangen, dass in flüssigem Wasser analog zu den Phasen des amorphen Eises, eine hochdichte (high density liquid, HDL) und eine niedrigdichte Phase (low density liquid, LDL) existieren. Bei Änderung der Temperatur kann unterkühltes Wasser von einer in die andere Phase übergehen. Dabei ändert sich die Temperaturabhängigkeit der Dynamik von fragil nach stark. Einen guten Überblick über diesen und verschiedene andere Erklärungsansätze zu Erklärung der Anomalien von Wasser ist in [107] zu finden.

Tab. 2.1.: Vereinfachender Überblick über die vier vorgestellten Modelle zum dynamischen Übergang

	Frauenfelder	Doster	Ngai	Chen
Ursache St. 1 (T_g)	-	β -Prozess bei T_g	Volumenänderung bei T_g	-
Ursache St. 2 (T_D)	β_H -Prozess	α -Prozess	β_{JG} -Prozess	FST
Konzept	Slaving+E.-Landschaft	MCT	Kopplungsmodell	LLCP

Der Ansatz von Chen et al., den dynamischen Übergang als Konsequenz des Fragil-Stark-Übergangs von Wasser zu erklären, unterscheidet sich deutlich von den übrigen drei Ansätzen. Den von Chen et al. angeführten Belegen für einen FST [40, 152, 179] wurden von verschiedenen Autoren widersprochen [60, 61, 136, 209, 225, 270]. Neben Argumenten auf der Ebene von Messtechnik [225] und Datenauswertung [61] führt z.B. Doster gegen einen FST als Ursache für den dynamischen Übergang an, dass der beobachtete Übergang auflösungszeitabhängig ist, der FST es aber nicht sein dürfte [39]. Weiterhin kann auch die beobachtete Lösemittelabhängigkeit des dynamischen Übergangs nicht auf einen Fragil-Stark-Übergang im Wasser zurück geführt werden.

Die drei anderen Ansätze unterscheiden sich auf subtilere Weise. Frauenfelder billigt dem gering hydratisierten Protein keinen strukturellen Relaxationsprozess zu, während Doster den zeitskalenabhängigen Übergang in seinem Zwei-Stufen-Szenario auf einen α -Prozess zurückführt [58]. Die beiden Ansätze unterscheiden sich weiterhin dadurch, dass Doster die Beschreibung des Protein-Wasser-Systems im Rahmen eines Energielandschaftsmodells zurückweist. Er begründet dies damit, dass ein Flüssigkeit sich nicht durch eine statische Energielandschaft beschreiben lässt und das Gesamtsystem aus Protein und Lösemittel auch durch eine veränderliche Energielandschaft beschrieben werden müsste [59]. Ngai wiederum kritisiert an Doster, dass dessen Ansatz auf Wasserstoffbrückenbindungsfluktuationen beruht und folglich seine Gültigkeit endet, wenn andere Lösemittel verwendet werden, die keine Wasserstoffbrückenbindungen bilden [34].

Dieser Überblick über die aktuelle Diskussion lässt sich damit zusammenfassen, dass es eine Reihe von offenen Fragen zum Thema dynamischer Übergang gibt. Sie lauten:

- Was ist der mikroskopische Ursprung des dynamischen Übergangs?
- Handelt es sich bei den beteiligten Proteinbewegungen um α - oder β -Relaxationen?
- Wie genau ist die Proteindynamik mit der Wasserdynamik verknüpft?

In Kapitel 8 werden die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse hinsichtlich ihrer Bedeutung für den dynamischen Übergang diskutiert sein.

3 Methoden

In dieser Arbeit werden drei Methoden eingesetzt: zwei experimentelle, ^2H -NMR-Spektroskopie und Neutronenstreuung und eine Simulationstechnik, MD-Simulationen. Die experimentellen Methoden sind Spektroskopie-Methoden und beruhen auf ähnlichen Grundprinzipien, die zunächst allgemein skizziert werden sollen. Im Anschluss daran werden die spezielleren Grundlagen der einzelnen Methoden und Experimente eingeführt, die für das Verständnis dieser Arbeit notwendig sind. Begonnen wird mit der Technik ^2H -NMR-Spektroskopie daran schließen sich Neutronenstreuung und MD-Simulation an.

3.1 Grundprinzipien einer spektroskopischen Messung

Eine spektroskopische Messung lässt sich sehr allgemein mit folgendem Konzept beschreiben [16]: Das untersuchte System, Reservoir genannt, besteht aus N Teilchen und wird durch einen Hamilton-Operator \hat{H}_R charakterisiert. Mit der Wahrscheinlichkeit p_m ist es im Zustand m mit der Energie E_m zu finden.

$$p_m = \frac{1}{Z_R} \exp(-E_m/(k_B T)) \quad (3.1)$$

k_B ist hierin die Boltzmann-Konstante und Z_R steht für die Zustandssumme $Z_R = \sum_m \exp(-E_m/(k_B T))$.

Als Testobjekt, Sonde (engl. Probe), dient nun z.B. elektromagnetische Strahlung im Fall der NMR-Spektroskopie oder ein Neutron im Fall der Neutronenstreuung. Diese Sonde wird mit einem Hamiltonoperator \hat{H}_p beschrieben. Die Wechselwirkung oder Kopplung zwischen Sonde und Reservoir lässt sich ebenfalls mit einem Hamiltonoperator \hat{H}_c erfassen.

Das Schema der spektroskopischen Messung in dieser formellen Betrachtung beginnt mit der Präparation der Sonde in einem definierten Zustand $|m\rangle$. Durch Wechselwirkung mit dem untersuchten System ändert die Sonde ihren Zustand zu $|n\rangle$. Gleichzeitig ändert sich unter Annahme einer kleinen¹ zeitabhängigen Wechselwirkung $\hat{H}_c(t)$ der Zustand des Reservoirs von $|m'\rangle$ nach $|n'\rangle$. Der Hamiltonoperator der Sonde lässt sich als Summe eines zeitunabhängigen und eines zeitabhängigen Terms schreiben:

$$\hat{H}_p(t) = \hat{H}_{p0} + \hat{H}_c(t) \quad (3.2)$$

¹ klein im Vergleich zu den Hamiltonoperatoren \hat{H}_r und \hat{H}_p (lineare Näherung)

Diese kleine Störung des Gleichgewichtszustandes durch den zeitabhängigen Term wird im Rahmen der Störungstheorie erster Ordnung behandelt und führt im Ergebnis zu Fermis Goldener Regel:

$$W_{nn'mm'} = \frac{2\pi}{\hbar} \left| \langle n' | \langle n | \hat{H}_c | m \rangle m' \rangle \right|^2 \delta(E_m + E'_m - E_n - E'_n) \quad (3.3)$$

Gleichung 3.3 besagt, dass die Übergangswahrscheinlichkeit pro Zeit $W_{nn'mm'}$, dass das Gesamtsystem aus Sonde und Reservoir vom Ausgangszustand $|m\rangle|n\rangle$ in einen Endzustand $|m'\rangle|n'\rangle$ übergeht, von dem Matrixelement $\left| \langle n' | \langle n | \hat{H}_c | m \rangle m' \rangle \right|^2$ abhängt.

In einer spektroskopischen Messung wird nun eine Größe gemessen, die proportional zur Änderung des Zustandes der Sonde W_{nm} ist, dabei wird über alle Zustände des Reservoirs summiert:

$$W_{nm} = \sum_{n'} \sum_{m'} W_{nn'mm'} p_{m'} = \frac{1}{Z} \sum_{n'} \sum_{m'} W_{nn'mm'} \exp(-E_m/(k_B T)) \quad (3.4)$$

mit p'_m aus Gleichung (3.1) als der Wahrscheinlichkeit pro Zeiteinheit, das Reservoir im Zustand m' zu finden. Gleichung (3.4) lässt sich ohne Beschränkung der Allgemeinheit so umschreiben, dass W_{nm} als Funktion der spektralen Dichte $C(\omega)$ des Kopplungs-Hamiltonoperators $\bar{H}_c = \langle n | \hat{H}_c | m \rangle$ ausgedrückt wird [16]:

$$W_{nm} = \frac{2\pi}{\hbar^2} C_{\bar{H}_c \bar{H}_c}(\omega) \quad (3.5)$$

worin $C_{\bar{H}_c \bar{H}_c}(\omega)$ für die Fouriertransformierte der zeitlichen Korrelationsfunktion des Kopplungs-Hamiltonoperators steht.

$$C_{\bar{H}_c \bar{H}_c}(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} C_{\bar{H}_c \bar{H}_c}(t) \exp(-i\omega t) dt \quad (3.6)$$

mit

$$C_{\bar{H}_c \bar{H}_c}(t) = \langle \bar{H}_c^+(0) \bar{H}_c(t) \rangle. \quad (3.7)$$

Unter Zeitumkehr gilt das detaillierte Gleichgewicht, das heißt die Wahrscheinlichkeit für Energiegewinn und Energieabgabe der Sonde reflektiert die Boltzmann-Verteilung der Besetzung der Zustände.

$$W_{mn} = \exp(-\hbar\omega/(k_B T)) W_{nm} \quad (3.8)$$

Die Messgröße, die proportional zu W_{nm} ist, ist folglich mit der Fouriertransformierten einer zeitlichen Korrelationsfunktion verknüpft, deren Form von der Kopplungswechselwirkung abhängt.

Der Kopplungshamilton-Operator lässt sich ganz allgemein schreiben als Produkt eines Vektoroperators \hat{I} mit einem Kopplungstensor \hat{T}_c , der von der Art der Wechselwirkung c abhängt und eines weiteren Vektoroperators \hat{K} [250].

$$\hat{H}_c = k_c \hat{I} \cdot \hat{T}_c \cdot \hat{K} \quad (3.9)$$

In der ^2H -NMR-Spektroskopie dominiert die Quadrupolwechselwirkung die Interaktion der Sonde (= elektromagnetischer Strahlung) mit dem System, das als Hilbertraum der Kernspins aufgefasst werden kann. In der Neutronenstreuung sind Neutronen die Sonde, die als Operator auf dem Ort der Kerne \vec{R} im Zustandsraum der Probe operiert. Die betrachtete Korrelationsfunktion des Wechselwirkungs-Hamiltonoperators \hat{H}_c unterscheidet sich folglich für die beiden Methoden.

Im einfachsten Fall hinreichend schneller Bewegungen lässt sich der Kopplungs-Hamiltonoperator als stochastisch fluktuierende Größe f annehmen. Je nach Wechselwirkung spielt hier nur die Zeit oder auch der Ort der Teilchen eine Rolle. Es werden also einfache (nur zeitliche) Korrelationsfunktionen und raum-zeitliche Korrelationsfunktionen unterschieden [239]. Die Definition der einfachen normierten Autokorrelationsfunktion einer stochastisch fluktuierenden Größe f lautet

$$C(t) = \frac{\langle f(0)f(t) \rangle}{\langle f^2(0) \rangle} \quad (3.10)$$

Die spitzen Klammern zeigen ein Zeitmittel an.

Für raum-zeitliche Korrelationsfunktionen lautet die Definition

$$G(\vec{r}, t) = \frac{\langle f(\vec{0}, 0)f(\vec{r}, t) \rangle}{\langle f^2(\vec{0}, 0) \rangle} \quad (3.11)$$

In raum-zeitlichen Korrelationsfunktionen stehen die spitzen Klammern für ein Zeit- und ein Ensemblemittel. In ergodischen Systemen ist das Zeitmittel gleich dem Ensemblemittel.

Die Kopplungs-Hamiltonoperatoren der ^2H -NMR-Spektroskopie hängt von der Orientierung des Wechselwirkungstensors \hat{T} relativ zu einem externen Magnetfeld ab. Folglich lässt sich der Hamiltonoperator als stochastische Variable mit fluktuierender Orientierung auffassen. Die relevanten Korrelationsfunktionen sind demnach einfache, winkelabhängige Korrelationsfunktionen. Winkelabhängige Korrelationsfunktionen lassen sich durch Einsetzen einer stochastischen Orientierung in die Korrelationsfunktion Gleichung (3.10) allgemein behandeln [258]. Es ergibt sich eine Korrelationsfunktion von Legendrepolyomen P_L der Orientierung θ , die vom Rang L des Wechselwirkungstensors abhängt.

$$C_L(t) = \langle P_L(\cos \theta(0))P_L(\cos \theta(t)) \rangle (2L + 1) \quad (3.12)$$

In der NMR-Spektroskopie werden die vorherrschenden Wechselwirkungen durch einen Tensor der zweiten Stufe beschrieben. Einen Tensor von Rang 1 liefert beispielsweise die Beschreibung der Wechselwirkung in der dielektrischen Spektroskopie.

Der Hamiltonoperator in der Neutronenstreuung ergibt eine raum-zeitliche Korrelationsfunktion. Dies kann aus der Kombination der Gleichungen (3.6) und (3.9) mit dem Wechselwirkungspotential in Tabelle 3.1 entnommen werden. Mit der Definition der Dichte

$$\rho(\vec{r}, t) = \sum_i \delta(\vec{r} - \vec{R}_i(t)) \quad (3.13)$$

lässt sich der Hamiltonoperator in Tabelle 3.1 als Funktion der Dichte schreiben und die Korrelationsfunktion der Neutronenstreuung lautet demnach

$$G(\vec{r}, t) \propto \frac{\langle \rho(\vec{0}, 0) \rho(\vec{r}, t) \rangle}{\langle \rho^2(\vec{0}, 0) \rangle}. \quad (3.14)$$

Die wichtigsten Zusammenhänge sind in Tabelle 3.1 jeweils für die ^2H -NMR-Spektroskopie und die Neutronenstreuung beispielhaft gegenübergestellt.

Wir haben nun gesehen, welche Art von Wechselwirkungen und Korrelationsfunktionen die Übergangswahrscheinlichkeit W_{nm} beschreiben. Beim Messen wird, wie in Gleichung (3.5) gezeigt, die Fouriertransformierte der Korrelationsfunktion bestimmt. Für die NMR-Spektroskopie ist dies die spektrale Dichte

$$J_2(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} C_2(t) \exp(i\omega t) dt \quad (3.15)$$

in der Neutronenstreuung ist die Messgröße der doppeltdifferentielle Streuquerschnitt, bzw. der dazu proportionale dynamische Strukturfaktor $S(\vec{q}, \omega)$. Dieser wird durch zweifache Fouriertransformation aus der räumlich-zeitlichen Korrelationsfunktion $G(\vec{r}, t)$ gewonnen

$$S(\vec{q}, \omega) \propto \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} G(\vec{r}, t) \exp(i\vec{q}\vec{r}) \exp(i\omega t) d\vec{r} dt. \quad (3.16)$$

Die nach der ersten räumlichen Transformation entstehende Korrelationsfunktion $S(\vec{q}, t)$ wird dabei als intermediäre Streufunktion bezeichnet

$$S(q, \omega) = \int_{-\infty}^{\infty} S(\vec{q}, t) \exp(-i\omega t) dt. \quad (3.17)$$

Im Rahmen der Linearen-Antwort-Theorie lassen sich die Messgrößen der beiden verschiedenen Methoden mit einem gemeinsamen Begriff fassen: dem dissipativen Anteil χ'' der generalisierten Suszeptibilität $\chi = \chi' + i\chi''$ [170]. Für kleine Störungen besagt

Tab. 3.1.: Übersicht über den Messprozess ausgehend vom Hamiltonoperator bis zur Messgröße für ^2H -NMR-Spektroskopie (links) und Neutronenstreuung (rechts).

	^2H -NMR	Neutronenstreuung
Sonde	elektromagnetische Strahlung	Neutronen
\hat{H}_c :	Quadrupolwechselwirkung	Fermi-Pseudopotential
Abhängig von	elektrischer Feldgradient $\vec{\nabla}E$	Positionen der Kerne \vec{R}_i
Tensoroperator \hat{T}^c	$\hat{T}^c = \hat{V}^Q$ mit $L = 2$	$\hat{T}^c = \hat{V}^{FP}$ mit $L = 0$
Potential	$V_{\alpha\beta}^Q = \frac{\partial E_\alpha}{\partial r_\beta} = \frac{\partial \Phi}{\partial \alpha \partial \beta}$	$V(\vec{r})^{FP} = \frac{2\pi\hbar^2}{m} b_i \delta(\vec{r} - \vec{R}_i)$
Korrelationsfunktion	zeitlich: $C_2(t)$	raum-zeitlich: $G(\vec{r}, t)$
Messgröße:	spektrale Dichte $J_2(\omega) \propto FT(C_2(t))$	dynamischer Strukturfaktor $S(\vec{q}, \omega) \propto FT(G(\vec{r}, t))$

die Lineare-Antwort-Theorie, dass die Reaktion einer Probe auf eine schwache externe Stimulation oder Störung proportional zum Spektrum $\chi''(\omega)$ der spontanen Fluktuationen ist. Dieses Ergebnis formuliert das Fluktuations-Dissipationstheorem [150]:

$$W_{mn}(\omega) \propto \frac{1}{\exp(-\hbar\omega/(k_B T))} \text{Im } \chi''(\omega) \quad (3.18)$$

Der Vorfaktor $\exp(-\hbar\omega/(k_B T))$ folgt aus der Gültigkeit des detaillierten Gleichgewichts (3.8). Für die NMR-Spektroskopie gilt $\hbar\omega \ll (k_B T)$ und folglich weiterhin $\exp(-\hbar\omega/(k_B T)) \approx 1 - \hbar\omega$, so dass zwischen spektraler Dichte und Suszeptibilität der betrachteten Variablen folgende Beziehung besteht

$$J(\omega) \propto \frac{1}{\omega} \chi''(\omega), \quad (3.19)$$

während für die Neutronenstreuung diese Näherung nicht gilt und somit die Messgröße über

$$S(\vec{q}, \omega) \propto \frac{1}{\exp(-\hbar\omega/(k_B T))} \chi''(\omega) \quad (3.20)$$

mit dem Imaginärteil der Suszeptibilität verknüpft ist.

Verknüpfung von Messgröße und Bewegungsmodell: Beispiele für die Suszeptibilität

Um die Suszeptibilität zu beschreiben, gibt es verschiedene empirische Modelle. Hier sollen nun vier erfolgreich angewandte experimentelle Parametrisierungen von Suszeptibilitäten vorgestellt werden. Einen guten Überblick über diese und weitere häufig in der NMR-Spektroskopie verwendete Modelle ist in den Reviews von Noack [198] und Bergman [20] zu finden.

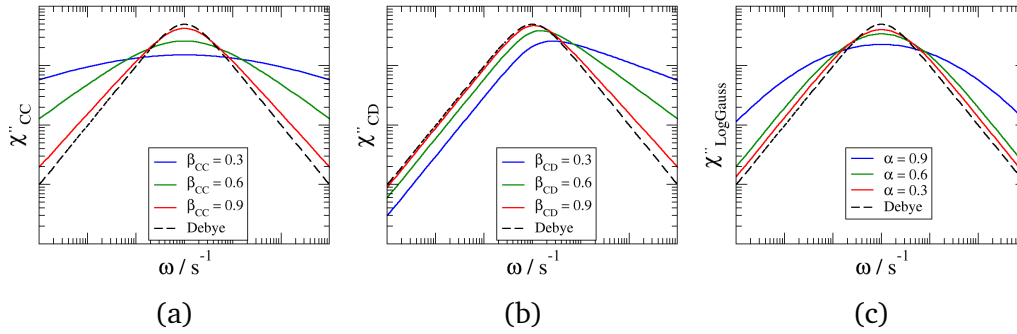


Abb. 3.1: Auftragung des Imaginärteils verschiedener Suszeptibilitäten. In jedem Bild ist die Debye-Form als Vergleich eingezeichnet a) Cole-Cole-Suszeptibilität b) Cole-Davidson-Suszeptibilität, c) Log-Gauß-Suszeptibilität.

Für einen einfachen stochastischen Prozess, dessen Korrelationsfunktion exponentiell in der Zeit abfällt, ergibt sich die Suszeptibilität nach Debye

$$\chi_D(\omega) = \frac{1}{1 + i\tau\omega}. \quad (3.21)$$

In Abbildung 3.1(a-c) ist der Imaginärteil von Gleichung (3.21) als gestrichelte Linie eingezeichnet. Der Debye-Peak besitzt in der Frequenzdarstellung eine symmetrische Form mit Potenzgesetzen $\chi'' \propto \omega^1$ und $\chi'' \propto \omega^{-1}$ auf der Hoch- bzw. Tieffrequenzseite.

Statt einer Frequenzabhängigkeit von $\chi'' \propto \omega^{\pm 1}$ wird insbesondere für sekundäre Relaxationsprozesse [196] ein symmetrisch verbreiteter Peak gefunden. Dieser kann mit der Suszeptibilität nach Cole-Cole beschrieben werden [43]

$$\chi_{CC}(\omega) \propto \frac{1}{1 + (i\omega\tau_{CC})^{\beta_{CC}}}. \quad (3.22)$$

Die Fouriertransformation der Suszeptibilität nach Cole-Cole ergibt die Mittag-Leffler-Funktion [279], die in Kapitel 2.2 zur Beschreibung subdiffusiver Dynamik eingeführt wurde.

In Abgrenzung dazu weist der Imaginärteil der häufig verwendeten Suszeptibilität nach Cole-Davidson [51] eine asymmetrische Funktion in der Frequenzdarstellung auf. Diese Funktion wird häufig zur Beschreibung der α -Relaxationen in Glasbildnern verwendet [7, 25]

$$\chi_{CD}(\omega) \propto \frac{1}{(1 + i\omega\tau_{CD})^{\beta_{CD}}}. \quad (3.23)$$

Für den Imaginärteil ergibt sich ein Potenzgesetz mit $\omega^{-\beta}$ ($\beta < 1$) auf der Hochfrequenzseite des Spektrums (vgl. Abb. 3.1(b)). Mit Hilfe der Cole-Davidson-Suszeptibilität lassen sich gestreckt exponentielle Abfälle, die mit einem Kohlrausch-Williams-Watts-Gesetz (Gl. (2.10)) angepasst werden, annähern. Es lässt sich jedoch

keine exakte Umrechnung erzielen, da sich die zu Grunde liegenden Korrelationszeitenverteilungen unterscheiden. Während es im Cole-Davidson Fall eine definierte Abschnidefrequenz gibt, existiert im KWW-Fall ein exponentieller Abfall der Korrelationszeitenverteilung [164].

In dem in Kapitel 2.2.1 eingeführten Energielandschaftsmodell wird von einer Gaußverteilung von Energiebarrieren ausgegangen (vgl. Gl. (7.3)). Diese führt zu einer log-Gauß-verteilten Korrelationszeitenverteilung. Der Imaginärteil der Suszeptibilität für die Log-Gauß-Verteilung von Korrelationszeiten lautet

$$\chi''_{\log\text{Gauß}}(\omega) = \omega \int_{-\infty}^{\infty} \frac{\alpha}{\pi^{1/2}} \frac{2\tau \exp z - \alpha^2 z^2}{1 + \omega^2 \tau_0^2 \exp 2z} dz, \quad (3.24)$$

mit τ_0 als der Peakkorrelationszeit der Verteilung, dem Breitenparameter $0 < \alpha < \infty$ und $z = \ln(\tau/\tau_0)$. Die Frequenzdarstellung ist in Abb. 3.1(c) für verschiedene Werte der Breite σ_E der Energiebarrierenverteilung zu sehen. Eine größere Breite führt zu einer Änderung der Steigung der Hochfrequenzseite.

In diesem Kapitel wurden die Prinzipien einer spektroskopischen Messung erläutert, wie sie sowohl auf NMR-Spektroskopie als auch auf Neutronenstreuung zutreffen. In den nun folgenden Abschnitten wird zunächst auf die Besonderheiten der ^2H -NMR-Spektroskopie eingegangen, bevor die Neutronenstreuung eingeführt wird.

3.2 ^2H -NMR-Spektroskopie

Mit der Technik Kernspinresonanzspektroskopie (engl. nuclear magnetic resonance, NMR) ist es möglich, Kernspinsysteme zu manipulieren und durch Messung der makroskopischen Magnetisierung der Probe Aufschluss über molekulare Bewegungen zu gewinnen.

In der vorliegenden Arbeit kommt die ^2H -NMR-Spektroskopie zum Einsatz. Die Beschreibung der Methode beschränkt sich deshalb auf diesen Bereich. Einen weiteren Blick ermöglichen die einführenden Werke von Levitt [161] und Fukushima [85], die theoretischen Grundlagen vertieft Abragam [1] und Anwendungen der NMR-Spektroskopie beschreiben Schmidt-Rohr und Spieß in [239].

In diesem Kapitel werden nun anknüpfend an das Grundprinzip der spektroskopischen Messung in Kap. 3.1 zunächst die Grundlagen vorgestellt. Zur Untersuchung der Proteindynamik wurden drei Experimente verwendet, mit denen sich Dynamik über einen Zeitbereich von ca. 10 Größenordnungen messen lässt. Diese drei Experimente und Details zu ihrer Auswertung werden hier vorgestellt.

3.2.1 Grundlegendes

NMR-Spektroskopie wird in einem starken statischen Magnetfeld durchgeführt. Aufgrund der Zeeman-Wechselwirkung spalten die Energieniveaus der Kernspins in einem Magnetfeld auf. Die Zustände unterschiedlicher Energie werden nach Boltzmann besetzt. Dies führt zu einer makroskopischen Magnetisierung.

Durch Radiofrequenzpulse kann das Spinsystem manipuliert werden und diese makroskopische Magnetisierung gezielt selektiert, gespeichert oder abgefragt werden. Ein NMR-Experiment besteht aus einer Folge von Pulsen in deren Anschluss die makroskopische Magnetisierung in der xy-Ebene gemessen wird. Der zeitliche Verlauf des Messsignals in der xy-Ebene wird als „free induction decay“ (FID) bezeichnet und ist die primäre Messgröße der NMR.

Die lokale Magnetfeldstärke am Ort eines Atoms wird außer durch die externen Magnetfelder auch durch innere Wechselwirkungen verändert. Die Bewegung der kernspintragenden Atomkerne relativ zueinander und relativ zum externen Magnetfeld ändert die Stärke der Wechselwirkung und hat Einfluss auf den zeitlichen Abfall der Magnetisierung.

Nachfolgend werden zunächst die Wechselwirkungen näher eingeführt. Anschließend wird vorgestellt, wie sich das Spinsystem quantenmechanisch beschreiben lässt. Der darauf folgende Abschnitt geht auf Relaxationsphänomene ein und schließlich wird der Aufbau des verwendeten Spektrometers kurz dargelegt.

Wechselwirkungen

Wie im Grundprinzip der spektroskopischen Messung eingeführt, lässt sich eine spektroskopische Messung eines Systems mit Hilfe einer Sonde und der Wechselwirkung zwischen Sonde und System beschreiben. Im Fall der NMR-Spektroskopie ist die Sonde die elektromagnetische Strahlung, die auf dem Hilbertraum der möglichen Zustände des Kernspinoperators \hat{I} operiert.

Ein Spin wechselwirkt mit einem externen Magnetfeld B_0 über die Zeeman-Wechselwirkung. Der Hamiltonoperator lautet ²

$$\hat{H}_Z = -\gamma \hat{\vec{I}} \cdot \vec{B}_0 = -\gamma I_z B_z \quad (3.25)$$

mit dem isotonenabhängigen, gyromagnetischen Verhältnis γ . Für Deuteronen ist $I = 1$ und $\gamma = 41.065 \cdot 10^6 \text{ rad/(s T)}$ [161]. Die Zeeman-Wechselwirkung ist vom äußeren Magnetfeld festgelegt und kann als zeitunabhängiger Teil des Gesamthamiltonoperators in Gleichung (3.2) angesehen werden.

² In der NMR-Spektroskopie ist es üblich den Hamiltonoperator in Einheiten von \hbar darzustellen. Dieser Konvention wird hier gefolgt.

Um das Spinsystem zu manipulieren, werden in der NMR-Spektroskopie Radiofrequenzpulse verwendet, die ein oszillierendes Magnetfeld B_1 senkrecht zu B_0 einstrahlen. Die Wechselwirkung eines Spins mit diesem Magnetfeld ist analog gegeben als:

$$\hat{H}_{RF} = -\gamma \vec{I} \cdot \vec{B}_1. \quad (3.26)$$

Sie ist Teil des zeitabhängigen Terms in Gleichung (3.2). Im klassischen Bild vollführt ein Spin eine Präzessionsbewegung um ein Magnetfeld herum mit der Frequenz $\omega_L/(2\pi)$. Diese ist proportional zur Energiedifferenz zwischen den Zeeman-Niveaus

$$E_m = -m\gamma B_0 = -m\omega_L \quad (3.27)$$

mit $m = -I, I+1, \dots, I-1, I$ und der Larmorfrequenz $\omega_L = \gamma B_0$. Für Deuteronen mit Spin $I = 1$ ergeben sich damit drei Energieniveaus, die gemäß einer Boltzmann-Verteilung besetzt werden. Ein Übergang zwischen diesen Niveaus ist mit der in Gleichung (3.4) eingeführten Übergangswahrscheinlichkeit verknüpft.

Der zeitabhängige Term des Hamiltonoperators in Gleichung (3.2) wird darüber hinaus durch verschiedene elektromagnetische Wechselwirkungen beeinflusst. Dies sind z.B. die chemische Verschiebung, die Dipol-Dipol-Wechselwirkung und die Quadrupolwechselwirkung. Die allgemeine Schreibweise des Hamiltonoperators für diese Wechselwirkungen wurde mit Gleichung (3.9) eingeführt. Im Fall von ^2H -NMR-Spektroskopie dominiert die Quadrupolwechselwirkung, weshalb hier nur diese Wechselwirkung näher erläutert werden soll. Der Hamiltonoperator \hat{H}_Q lautet:

$$\hat{H}_C = \hat{H}_Q = C \vec{I} \cdot \vec{\tilde{V}} \cdot \vec{I} = \frac{eQ}{2I(2I-1)\hbar} \hat{I} \vec{\tilde{V}} \hat{I} \quad (3.28)$$

mit der elektrischen Ladung des Elektrons e , dem Quadrupolmoment des Kerns Q und dem elektrischen Feldgradiententensor $\vec{\tilde{V}}$. Die Quadrupolwechselwirkung resultiert aus einer nicht kugelsymmetrischen Kernladungsverteilung für einen Kernspin mit $I > 1/2$ und einem elektrischen Feldgradienten am Kernort. Die Komponenten des elektrischen Feldgradiententensors V sind definiert als

$$V_{\alpha\beta} = \frac{\partial^2 \Phi}{\partial r_\alpha \partial r_\beta} \quad (3.29)$$

mit Φ als dem elektrischen Potential.

Da die Zeeman-Wechselwirkung für Deuteronen viel größer als die Quadrupolwechselwirkung ist $\hat{H}_z \gg \hat{H}_Q$, lässt sich die Rechnung vereinfachen, indem nur der säkulare Teil des Hamiltonoperators \hat{H}_Q , also derjenige, der mit dem Zeeman-Hamiltonoperator \hat{H}_z kommutiert, berücksichtigt wird. Alle übrigen Terme können vernachlässigt werden. Gleichung (3.28) wird folglich zu:

$$\hat{H}_Q = \frac{(eQ)V_{ZZ}}{4I(2I-1)\hbar} [3I_z^2 - I(I+1)] \quad (3.30)$$

mit $V_{zz} = eq$. Wird die Gleichung ins Laborsystem transformiert, dann ist zu erkennen, dass die Resonanzfrequenz ω_Q der einzelnen Spins von der Orientierung der Hauptachse des Wechselwirkungstensors relativ zum äußeren Magnetfeld, ausgedrückt durch die Winkel θ und ϕ , abhängt:

$$\omega_Q(\theta, \phi) = \pm \frac{\delta}{2} \left[3 \cos^2 \theta - 1 - \eta \sin^2 \theta \cos(2\phi) \right]. \quad (3.31)$$

Die Parameter δ und η dieser Gleichung sind wie folgt definiert:

$$\delta = \frac{3}{4} \frac{eQeq}{\hbar} \quad \text{und} \quad \eta = \frac{V_{xx} - V_{yy}}{V_{zz}}. \quad (3.32)$$

δ , der Anisotropieparameter, auch Kopplungskonstante genannt, gibt die Wechselwirkungsstärke an und hat für eine aliphatische C-²H-Bindung den Wert $\delta = 2\pi \times 125$ kHz. Der Parameter η ist der Asymmetrieparameter. Er beschreibt die Abweichung des Wechselwirkungstensors von axialer Symmetrie, für die C-²H-Bindung ist $\eta \approx 0$. Gleichung (3.31) vereinfacht sich dadurch und lässt sich mittels des zweiten Legendrepolynoms schreiben als:

$$\omega_Q(\theta) = \pm \frac{\delta}{2} \left[3 \cos^2 \theta - 1 \right] = \pm \delta P_2(\cos(\theta)) \quad (3.33)$$

Die mittels ²H-NMR-Spektroskopie gemessene Größe ist folglich die Reorientierung der C-²H-Bindungsachse abhängig.

Mittels dieser Wechselwirkungen wird einerseits das Spinsystem derart präpariert, dass definierte Zustände eingenommen werden, andererseits wird der Hamiltonoperator des Gesamtsystems von der Dynamik in der Probe beeinflusst. Im nächsten Abschnitt wird dargestellt, wie die Veränderung des Gesamtsystems mittels der eingeführten Wechselwirkungen beschrieben und manipuliert werden kann.

Beschreibung eines Spinsystems

Bei Messungen mit NMR-Spektroskopie wird das Spinsystem manipuliert. Dieses besteht aus ca. 10^{24} Teilchen. Dieses System zu beschreiben ist ein statistisches Problem. Die Kenntnis des Hamiltonoperators erlaubt die quantenmechanische Beschreibung des Spinsystems im thermischen Gleichgewicht über den Dichtematrix-Formalismus. Hierzu wird der Dichteoperator des Spinsystems $\hat{\rho}$ verwendet. Im Gleichgewicht folgt die Besetzungswahrscheinlichkeit des Dichteoperators der klassischen Boltzmann-Verteilung:

$$\hat{\rho}_{eq} = \frac{1}{Z} \exp(-\hat{H}/k_B T) \quad \text{mit} \quad Z = \text{Tr} \left[\exp \left(-\frac{\hat{H}}{k_B T} \right) \right]. \quad (3.34)$$

Tr steht für die Spurbildung des Operators. Für Temperaturen $T > 1\text{ K}$ und bei dominieren der Zeeman-Wechselwirkung vereinfacht sich diese Gleichung zu

$$\hat{\rho}_{eq} = \hat{1} + \frac{\gamma B_0}{k_B T} \hat{I}_z. \quad (3.35)$$

Die zeitliche Entwicklung des Dichteoperators im Gleichgewicht und im Nichtgleichgewicht kann nun über die von-Neumann-Gleichung beschrieben werden

$$\frac{d\hat{\rho}}{dt} = -i [\hat{H}, \hat{\rho}]. \quad (3.36)$$

Prinzipiell können mit Hilfe des Dichtematrix-Formalismus die Mittelwerte der Observablen A über Spurbildung der von-Neumann-Gleichung (3.39) erhalten werden:

$$\langle A \rangle = Tr[\rho \hat{A}]. \quad (3.37)$$

Für einen zeitunabhängigen Hamiltonoperator wird die Gleichung (3.36) über

$$\hat{\rho}(t) = \exp(-i\hat{H}t)\hat{\rho}(0)\exp(i\hat{H}t) \quad (3.38)$$

gelöst. Um den Effekt der Zeeman-Wechselwirkung zu sehen, kann \hat{H}_z aus Gleichung (3.25) in Gleichung (3.38) eingesetzt werden. Für eine Anfangsmagnetisierung, die nicht in z-Richtung zeigt, lässt sich so erkennen, dass die Wirkung der Zeeman-Wechselwirkung einer Drehung um die z-Achse entspricht.

Diese Präzession um das externe Magnetfeld kann durch Transformation der Koordinaten in ein mit der Frequenz ω_L rotierendes Koordinatensystem eliminiert werden. Dadurch wird die von-Neumann Gleichung (3.36) zu:

$$\frac{d\hat{\rho}_R}{dt} = -i [\hat{H}_{RF} + \hat{H}_Q, \hat{\rho}_R]. \quad (3.39)$$

Die Wirkung des Radiofrequenz-Hamiltonoperators besteht wiederum in einer Drehung der Magnetisierung um die Achse des B_1 -Feldes. Damit wird eine Drehung der Gesamtmagnetisierung erreicht. Der Winkel Θ zwischen z-Achse und dem Magnetisierungsvektor hängt vom gyromagnetischen Verhältnis und der Länge Δ_p und Stärke des Pulses ab:

$$\Theta = \Delta_p \gamma B_1. \quad (3.40)$$

Die Quadrupolwechselwirkung \hat{H}_Q allein angewandt auf einen Anfangszustand des Dichteoperators $\hat{\rho}_R = \hat{I}_x$ ergibt:

$$\hat{\rho}_R(t) = \hat{I}_x \cos \omega_Q t - i \frac{[\hat{H}, \hat{I}_x]}{\omega_Q} \sin(\omega_Q t). \quad (3.41)$$

ω_Q ist hierin für eine C-²H-Bindung gegeben durch Gleichung (3.33). Im Experiment wird der Imaginärteil von Gleichung (3.41) wegen $Tr(I_x \cdot [\hat{H}_Q, I_x]) = 0$ nicht beobachtet. Das Messsignal oszilliert demnach mit $\cos(\omega_Q t)$. Die Magnetisierung ist proportional zur Dichtematrix

$$M(t) = |M_0| \cos(\omega_Q t) \hat{e}_x^R. \quad (3.42)$$

mit \hat{e}_x^R als dem Einheitsvektor in x-Richtung des rotierenden Koordinatensystems und oszilliert in x-Richtung.

Relaxation

Die Rückkehr eines Spinsystems nach externen Störungen ins Gleichgewichts beschreiben Relaxationsprozesse. Die dabei auftretende Änderung der makroskopischen Magnetisierung wird im einfachsten Fall mit Hilfe der Bloch-Gleichungen beschrieben:

$$\frac{dM'_x(t)}{dt} = -\frac{M'_x(t)}{T_2} \quad (3.43)$$

$$\frac{dM'_y(t)}{dt} = -\frac{M'_y(t)}{T_2} \quad (3.44)$$

$$\frac{dM_z(t)}{dt} = \frac{M_z(t) - M_0(t)}{T_1}. \quad (3.45)$$

Die Zeitkonstante, die den Abfall der Magnetisierung in der xy-Ebene beschreibt, wird transversale oder Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 genannt, die Zeitkonstante, die den Aufbau der Magnetisierung in der z-Richtung beschreibt, wird longitudinale oder Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 genannt. Die Spin-Spin-Relaxationszeit beschreibt den Verlust von Phasenkohärenz eines Spinensembles bei gleichbleibender Besetzung der Spinzustände. Dagegen ist die Ursache der Spin-Spin-Relaxationszeit eine Änderung der Besetzung der Zustände.

Wie in Abschnitt 3.1 mittels der Gleichungen (3.5), (3.7) und (3.10) gezeigt, ist die Übergangswahrscheinlichkeit zwischen zwei Zuständen proportional zur spektralen Dichte (s. Gl. (3.15)) verknüpfen. Bloembergen, Purcell and Pound [24] nutzten diesen Zusammenhang und zeigten, dass die spektrale Dichte mit der inversen Spin-Gitter-Relaxationsrate im Pulvermittel über folgende Beziehung verknüpft ist:

$$\left\langle \frac{1}{T_1} \right\rangle = \frac{2}{15} \delta^2 (J_2(\omega_0) + 4J_2(2\omega_0)). \quad (3.46)$$

Die Form der spektralen Dichte J_2 ist im Allgemeinen unbekannt. Durch Messung der Spin-Gitter-Relaxationszeit kann sie bei verschiedenen Temperaturen abgetastet werden. Um die Messdaten zu beschreiben können die in Kap. 3.1 vorgestellten Modelle für dynamische Prozesse eingesetzt werden, .

Aufbau des Spektrometers 'Mathilda'

Das in dieser Arbeit verwendete Spektrometer ist ein selbstgebautes Spektrometer der Arbeitsgruppen von Prof. Vogel und Prof. Fujara. Es besteht aus einem supraleitenden Oxford-Magneten mit einer Feldstärke von ca. 7.1 T. Hieraus ergibt sich nach Gleichung (3.25) eine Larmorfrequenz von $2\pi \times 46.1$ MHz für Deuteronen. Ein Kryostat von Konti des Typs CryoVac ermöglicht die Temperaturregelung mittels des Temperaturregler *TIC 304 MS Cryovac* mit einer Genauigkeit von ± 0.5 K [175]. In unmittelbarer Nähe der Probe wird die Temperatur zusätzlich über ein PT100 Widerstandsthermometer gemessen. Weitere Details zum Aufbau sind in [147] zu finden.

Die Steuerung des Aufbaus erfolgt mittels der Software DAMARIS (Darmstadt Magnetic Resonance Instrument Software) [88]. Zur Auswertung wurden Matlab-Programme verwendet, die ausgehend von Analyseskripten von Sorin Lusceac verändert wurden.

3.2.2 Messung der Relaxationszeit T_1

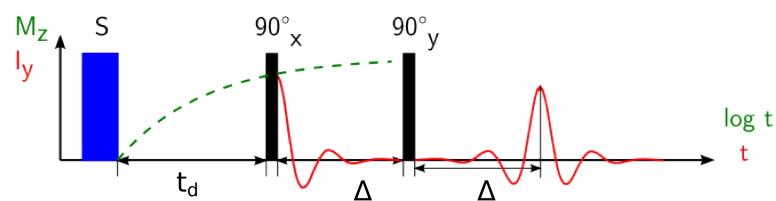


Abb. 3.2: Pulssequenz des Festkörperechos aus [147].

Mittels der Saturation-Recovery-Pulssequenz, die in Abbildung 3.2 gezeigt ist, kann die Spin-Gitter-Relaxationszeit der Deuteronen bestimmt werden. Dazu wird eventuell vorhandene Restmagnetisierung durch einen sogenannten Sättigungspuls zerstört und dem System anschließend Zeit gegeben, zu relaxieren. Nach der Zeit t_d wird mittels eines Festkörperecho die Magnetisierung gemessen. Eine Echo-Pulsfolge ist hier notwendig, um das Signal vollständig aufnehmen zu können und nicht während der apparativ bedingten Totzeit einen Teil des Signals zu verlieren. Als Funktion von t_d werden die Magnetisierungsaufbaukurven gemessen, aus denen die Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 extrahiert werden kann.

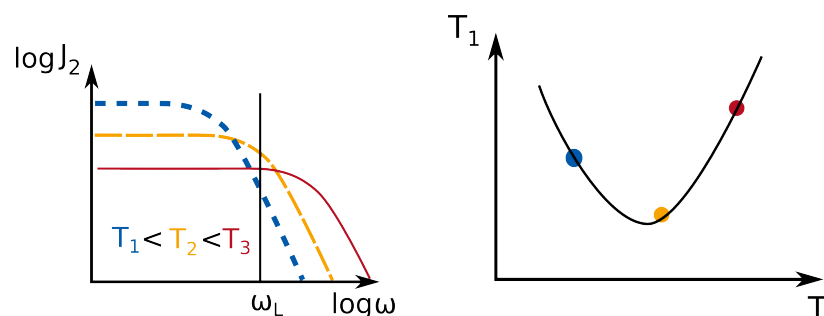


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der spektralen Dichte als Funktion der Frequenz für verschiedene Temperaturen. Bei der Beobachtung der spektralen Dichte bei einer festen Frequenz, ergibt sich für eine Temperatur ein Maximum und folglich wie in b) gezeigt für die Spni-Gitter-Relaxationszeit ein Minimum.

Die Spin-Gitter Relaxationszeit ist mit der spektralen Dichte $J(\omega_L)$ bei der Larmorfrequenz ω_L über Gleichung (3.46) verknüpft. Für einen einfachen exponentiellen Prozess gilt somit:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{2}{15} \delta^2 \left[\frac{\tau}{1 + (\omega_L \tau)^2} + \frac{4\tau}{1 + (\omega_L \tau)^2} \right]. \quad (3.47)$$

Der Index 2 der spektralen Dichte J_2 weist, wie in Kap. 3.1 eingeführt, darauf hin, dass eine Orientierungsautokorrelationsfunktion C_L mit $L = 2$ (vgl. Gl. (3.15)) Grundlage dieser Größe ist.

Die Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 tastet die spektrale Dichte bei der Larmorfrequenz ω_L und bei $2\omega_L$ ab. Aus der Temperaturabhängigkeit von T_1 kann Aufschluss über die Form der spektralen Dichte gewonnen werden. Wie in Abbildung 3.3(b) veranschaulicht, ergibt sich ein Minimum bei wenn die Rotationskorrelationszeit $\tau \approx 1$ ns, da dann $\tau(T)\omega \approx 1$. Für einen einfach exponentiellen Prozess beträgt der Wert der Spin-Gitter-Relaxationszeit im gegebenen Feld und für eine C-²H-Bindung am Minimum $\min(T_1(T)) = 2.4$ ms. Durch ein Vorliegen von Verteilungen wird dieser Wert erhöht und der Verlauf von $T_1(T)$ verbreitert.

3.2.3 Messung von Spektren

Spektren werden aus der Fouriertransformation des FID-Zeitsignals gewonnen. Um Totzeiteffekte zu vermeiden, wird in Festkörperproben das Echo-FID-Signal aus der oben beschriebenen Festkörperecho-Pulssequenz zur Spektrenberechnung herangezogen. Die Wartezeit im Experiment t_d wurde in dieser Arbeit zur Messung von Spektren (für vollrelaxierte Spektren) so lang gewählt, dass die Magnetisierung zu 98 % aufgebaut ist. Das gemessene Zeitsignal wird ab dem Echomaximum bei $t = 2\Delta$ fouriertransformiert.

Für das resultierende Spektrum gibt es zwei Grenzfälle:

- Im statischen Grenzfall, d.h. für langsame Bewegungen mit einer Korrelationszeit $\tau \gg 1/\delta$ bleibt jede Bindung während der Detektion in einer Orientierung und hat eine feste Frequenz nach Gleichung (3.31). Aus der Pulververteilung aller Bindungsorientierungen in einer amorphen Probe ergibt sich dann das soge-

nannte Pake-Spektrum, dargestellt in Abbildung 3.4 (rechts). Es kann analytisch für $\eta = 0$ mit der nachstehenden Gleichung berechnet werden [239]:

$$S_{\text{Pake}}(\omega) = \begin{cases} \frac{1}{\sqrt{6\delta}} \frac{1}{\left(\frac{1}{2}\delta - \omega\right)^{1/2}} & -\delta \leq \omega < -\delta/2 \\ \frac{1}{\sqrt{6\delta}} \left(\frac{1}{\left(\frac{1}{2}\delta + \omega\right)^{1/2}} + \frac{1}{\left(\frac{1}{2}\delta - \omega\right)^{1/2}} \right) & -\delta/2 \leq \omega \leq \delta/2 \\ \frac{1}{\sqrt{6\delta}} \frac{1}{\left(\frac{1}{2}\delta + \omega\right)^{1/2}} & \delta/2 < \omega \leq \delta \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (3.48)$$

Die Gesamtbreite des Spektrums beträgt 2δ . Zwischen den beiden Singularitäten liegt eine Frequenz von δ .

- Im Grenzfall $\tau \ll 1/\delta$ bewegt sich eine Bindung im Vergleich zur experimentellen Zeitskala sehr häufig und nimmt verschiedene Winkel relativ zum externen Magnetfeld ein. Detektiert wird folglich nur eine gemittelte Frequenz, die bei einer isotropen Bewegung ein Lorentzspektrum ergibt. Für eine anisotrope Bewegung wird dagegen ein verschmälertes Pake-Spektrum erhalten. Beide sind beispielhaft in Abbildung 3.4 (links) dargestellt.

Im intermediären Regime, d.h. wenn $\tau \approx 1/\delta$ ist, ändert sich das Spektrum je nach Korrelationszeit und Art der Bewegung. Aus der charakteristischen Spektrenform können daher mittels Linienformanalyse Informationen über die Geometrie der Bewegung erhalten werden: Die Spektren können für kleinwinklige Bewegungen durch zwei Größen weitergehend charakterisiert werden: die spektrale Breite δ/δ und die relative zentrale Intensität R/H [172, 269, 274, 275]. Die spektrale Breite wird hier als Breite des Spektrum bei 80 % der Höhe der Maxima normiert auf die Tieftemperaturbreite von $\delta = 2\pi \cdot 125 \text{ kHz}$ definiert. Die relative zentrale Intensität R/H charakterisiert die Intensität des Spektrum bei $\omega = 0$ [172]. Beide Größen sind in Abbildung 3.5 veranschaulicht.

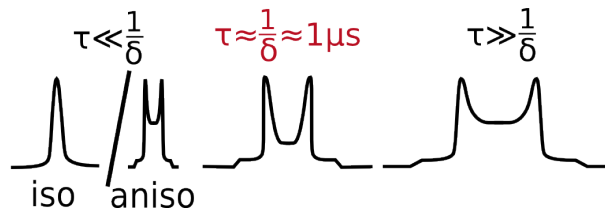


Abb. 3.4: Linienformentwicklung des Deuteronenpulverspektrums mit zunehmender Korrelationszeit (von links nach rechts). Im linken Bild ist ein Spektrum im schnellen Grenzfall gezeigt, zum einen für eine isotrope Reorientierung (Lorentzlinie) und zum anderen für den Fall anisotroper Reorientierung (verschmälertes Pakespektrum). Beträgt die Korrelationszeit etwa $1 \mu\text{s}$ (Mitte) dann sind die stärksten Linienformänderungen zu sehen. Im statischen Grenzfall (rechts) resultiert für $\text{C-}^2\text{H}$ Bindungen ein Pakespektrum.

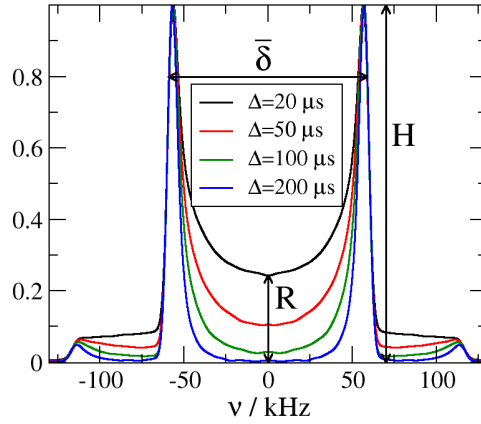


Abb. 3.5: Definition der relativen zentralen Intensität R/H am Beispiel von Spektren aus Random-Walk-Simulationen (s. 3.2.5) für einen Zufallssprung auf einem Konusrand mit halben Konusöffnungswinkel $\chi = 10^\circ$ und der Sprungkorrelationszeit $t_j = 10 \mu\text{s}$.

Unter Variation der Pulsabstandszeit Δ in der Solid-Echo-Pulssequenz lässt sich die Sensitivität des Experiments auf Kleinwinkeldynamik einstellen. Je größer Δ , desto größer ist die Änderung des Spektrums bei kleinwinkligen Bewegungen [269]. Beispielfhaft sind in Abbildung 3.5 die mittels Random-Walk-Simulationen berechneten Spektren eines RJoaC mit $\chi = 10^\circ$ für verschiedene Pulsabstände Δ dargestellt. Für eine detailliertere Diskussion von ^2H -NMR-1D-Spektren wird auf [269] verwiesen.

3.2.4 Messung der Reorientierungskorrelationsfunktion

Mit Hilfe des Stimulierten-Echo-Experiments ist die Reorientierungs-Autokorrelationsfunktion zugänglich. In der vorliegenden Arbeit wurde die sogenannte Zeeman-Pulssequenz verwendet. Sie ist in Abb. 3.6 abgebildet. In diesem Experiment wird die

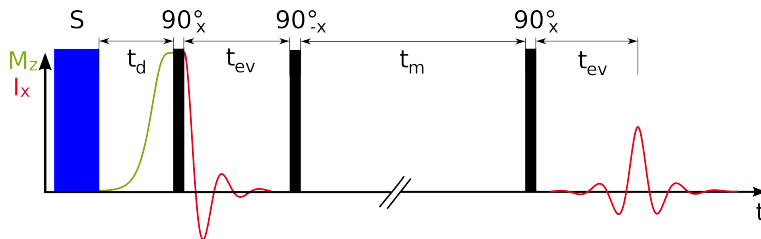


Abb. 3.6: Pulssequenz des Stimulierten-Echo-Experiments nach [239].

Phase ωt zu zwei Zeiten ($t \approx 0$ und $t = t_m$) gemessen und dann korreliert. Das Signal ist proportional zu:

$$F_2^{\cos}(t_m; t_p) \propto \langle \cos(\omega_Q(0)t_p) \cos(\omega_Q(t_m)t_p) \rangle. \quad (3.49)$$

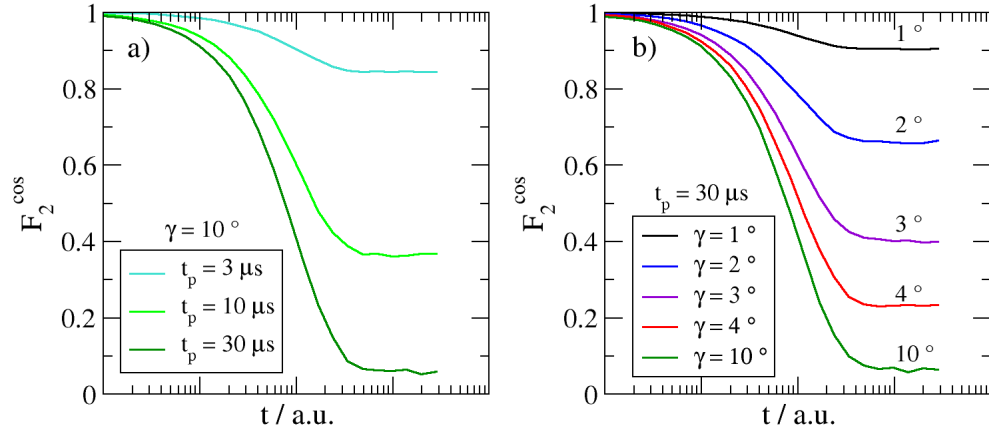


Abb. 3.7: Beispielkurven für die Änderung des Stimulierten-Echo-Signals bei einem Zufallssprung auf einem Konusrand unter Änderung a) der Evolutionszeit t_p und b) des Konusöffnungswinkels. Diese Kurven sind ohne Berücksichtigung des Abfalls der Magnetisierung durch die Spin-Gitter-Relaxationszeit berechnet. Die Korrelationszeit τ beträgt 10 ms.

Ein Abfall des Messsignals kann durch molekulare Dynamik verursacht werden, wenn sich die Quadrupolfrequenz während der Mischzeit t_m ändert. Doch auch die Relaxation der Gesamtmagnetisierung mit T_1 während der Mischzeit trägt zum Signalverlust bei. Die zu detektierende Bewegung muss daher schneller als die T_1 -Zeit sein.

Die gemessene Signalamplitude wird als Überlagerung beider Beiträge beschrieben:

$$F_2^{\cos}(t_m; t_p) = n \cdot \left[(1 - f_\infty(t_p)) \exp\left(- (t_m / \tau(t_p))^\beta\right) + f_\infty(t_p) \right] \cdot \exp\left(- (t_m / T_1)^{\beta_{T1}}\right). \quad (3.50)$$

Dabei wird der Signalabfall durch die Spin-Spin-Relaxation T_2 während t_p vernachlässigt. Der Abfall durch Spin-Gitter-Relaxation kann durch eine unabhängige Messung bestimmt werden.

Durch Variation der Evolutionszeit t_p kann die Sensitivität des Experiments auf Kleinwinkeldynamik eingestellt werden. Bei Evolutionszeiten von $30 \mu\text{s}$ und länger können Bewegungsamplituden von bis zu wenigen Grad aufgelöst werden [273–275].

Der Abfall der mit Random-Walk-Simulationen berechneten Stimulierten-Echo-Abfälle für einen Zufallssprung auf einem Konusrand (RJoac) bei verschiedenen Evolutionszeiten ist in Abbildung 3.7(a) gezeigt. Durch eine Verlängerung der Echoabstandszeit t_p nimmt die Amplitude des Abfalls zu. Daneben sind die Stimulierten-Echos unter Variation des Konusöffnungswinkels dargestellt. Die Vergrößerung des Konusöffnungswinkels führt ebenfalls zu einem zunehmend größeren Signalabfall. Bereits kleinwinklige Amplitude können detektiert werden.

Die Ergebnisse der Messungen mit ^2H -NMR-Spektroskopie sind in Kapitel 6 vorgestellt. In Ergänzung zu NMR-Messungen bietet es sich an, Random-Walk-Simulationen

durchzuführen, um verschiedene Bewegungsmodelle auf ihre Vereinbarkeit mit den experimentellen Ergebnissen zu testen. Das Prinzip von Random-Walk-Simulationen ist im folgenden Abschnitt vorgestellt.

3.2.5 Random Walk Simulationen

Random-Walk-Simulationen zur detaillierteren Analyse von NMR-Ergebnissen wurden bereits in den Promotionsarbeiten von Vogel [269] und Lusceac [172] sowie in der Masterarbeit von Sattig [231] durchgeführt. In den zitierten Arbeiten sind die Grundlagen hierzu ausführlich erklärt. Hier soll nur ein kurzer Überblick gegeben werden.

Ausgangspunkt für diese Art der Simulationen ist die Annahme, dass die molekulare Bewegung eine stochastische Bewegung ist. Für eine Zufallsbewegung liegt die Idee nahe, diese Art der Bewegungen mittels Zufallszahlexperimenten nachzubilden. Die Grundlage der Random-Walk-Simulationen zur Beschreibung von NMR-Observablen ist, dass jeder Orientierung eines Bindungsvektors eine gewisse Larmorfrequenz gemäß Gleichung (3.31) zugewiesen werden kann.

Der Ablauf einer in dieser Arbeit verwendeten Simulation hat das folgende Schema:

1. Wahl der Startorientierung gemäß eines Pulvermittels und Berechnung der Anfangslarmorfrequenz und der Anfangsphase
2. Ziehen einer Wartezeit $t_{w,i}$ aus einer exponentiellen Sprungkorrelationszeitenverteilung [172]

$$P(t_w) = \frac{1}{\tau_j} \exp\left(-\frac{t_w}{\tau_j}\right). \quad (3.51)$$

3. Ziehen einer neuen Orientierung und berechnen der neuen Larmorfrequenz mittels Gleichung (3.31)
4. Wiederholen von 2 und 3 bis eine Trajektorie der gewünschten Länge generiert ist.
5. Wiederholen von 1-4 bis eine ausreichende Anzahl an Random-Walkern erzeugt wurde.
6. Durchführen eines NMR-Experiments auf den Trajektorien. Das bedeutet, dass die Phasen der simulierten Teilchen im Zeitverlauf denselben Änderungen unterworfen werden, als würde ein NMR-Puls auf eine Spin einwirken. Aus den Trajektorien wird dann das Zeitsignal berechnet.
7. Berechnen der Spektren aus dem erhaltenen Zeitsignal analog zum Experiment.

In der vorliegenden Arbeit wurden Random-Walk-Simulationen zur Berechnung von ^2H -NMR-Spektren verwendet, um durch Vergleich der Parameter spektrale Breite und

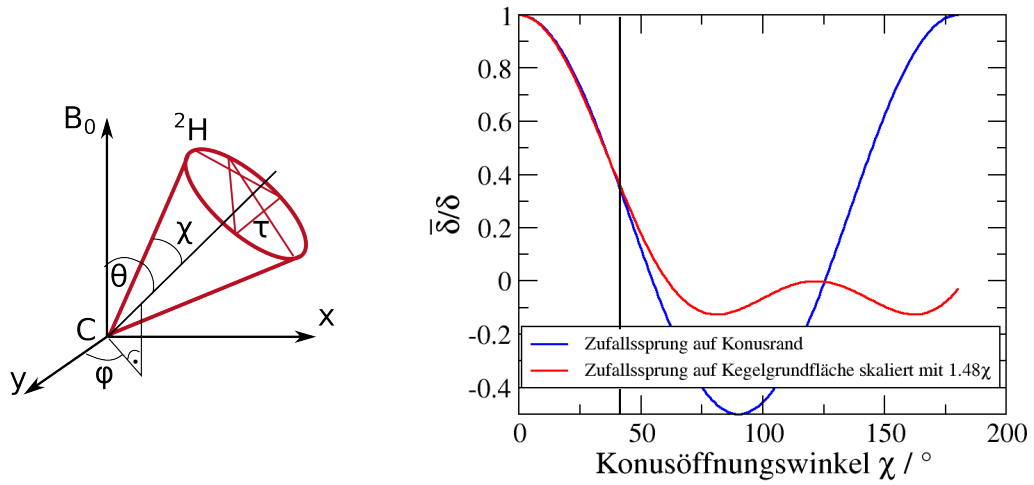


Abb. 3.8: a) Zufallssprung auf einem Konusrand. Die Parameter der Random-Walk-Simulation sind beispielhaft eingezeichnet. θ und ϕ bestimmen die Ausgangsorientierung. χ ist der Öffnungswinkel, τ steht für die Wartezeit. b) Skalierte spektrale Breite der beiden Konusmodelle. Durch Skalierung der Winkelachse im Modell Zufallssprung auf der Kegelgrundfläche mit dem Faktor 1.48 lassen sich die beiden Konusmodelle für kleine Winkel aufeinander abbilden.

relative zentrale Intensität für verschiedene Bewegungsmodelle mit den experimentellen Spektren Hinweise auf die Bewegung der C-²H-Bindung im Proteinerückgrat zu erhalten. Es zeigt sich, dass diese Bindungen im Proteinerückgrat kleinamplitudige Bewegungen ausführen, die sich mit einem Konusmodell beschreiben lassen. Das Konusmodell ist in Abb.3.8(a) veranschaulicht. Der halbe Konusöffnungswinkel wird mit χ bezeichnet.

Neben dem Zufallssprung auf dem Konusrand (RJoac), kann eine kleinamplitudige Bewegung auch als ein Zufallssprung auf einer Kegelgrundfläche modelliert werden. Die spektralen Breiten der Modelle lauten

$$\frac{\bar{\delta}}{\delta} = \frac{1}{2} [3 \cos^2(\chi) - 1] \quad (3.52)$$

für das RJoac-Modell und

$$\frac{\bar{\delta}}{\delta} = \frac{1}{2} \cos(\chi) [1 + \cos(\chi)] \quad (3.53)$$

für den Zufallssprung auf der Kegelgrundfläche [13]. Als Vorabtest zur Entscheidungsfindung, welches der beiden Modelle als Grundlage zur Modellierung der Proteinerückgratbewegung dienen soll, wurden diese zwei Konus-Modelle miteinander verglichen. In Abbildung 3.8(b) ist die spektrale Breite beider Modelle gezeigt. Für den Vergleich wurde die spektrale Breite aus dem Zufallssprung auf der Kegelgrundfläche mit dem Faktor 1.48 skaliert. Dann lassen sich die Ergebnisse für kleine Winkel

aufeinander abbilden. In den Simulationen dieser Arbeit wurde das RJoac-Modell als Bewegungsmodell gewählt. Die Ergebnisse der Random-Walk-Simulationen sind in Kapitel 6.2.1 vorgestellt.

3.3 Quasielastische Neutronenstreuung

Die zweite experimentelle Methode, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung von Protein und Wasserdynamik eingesetzt wird, ist quasielastische Neutronenstreuung. Ein erster Überblick wurde im Rahmen des einführenden Kapitels zur Spektroskopie bereits gegeben. Umfangreiche Einführungen zur Neutronenstreuung sind in den Büchern [16, 157, 170] gegeben. Einen kürzeren Überblick über Neutronenstreuungsmethoden zur Charakterisierung von Proteindynamik gibt der Übersichtsartikel von Gabel [87].

In diesem Abschnitt sollen in Anknüpfung an das allgemeine Prinzip einer spektroskopischen Messung die wesentlichen Grundlagen der Neutronenstreuung vorgestellt werden. Daran schließt sich die Vorstellung des verwendeten Spektrometers SPHERES an und zuletzt werden die durchgeführten Messungen und Details zur Datenbehandlung und Auswertung eingeführt.

3.3.1 Grundlagen

Die Sonde der Neutronenstreuung ist das Neutron. Trifft ein Neutron mit der Masse $m_n = 1.660 \cdot 10^{-27}$ kg und der Ladung 0 [16] auf Materie, so durchdringt es die Elektronenhülle eines Atoms ungehindert und wechselwirkt dann mit dem Kern. Das Neutron lässt sich als ebene Welle schreiben:

$$\psi_{ki}(r) \propto \exp(i\vec{k}_i \cdot \vec{r}). \quad (3.54)$$

Beim Streuprozess ändert das Neutron seinen Anfangszustand, gekennzeichnet durch den Wellenvektor \vec{k}_i zum Endzustand mit dem Wellenvektor \vec{k}_f . Die Differenz der beiden Wellenvektoren wird als Streuvektor \vec{q} bezeichnet

$$\vec{q} = \vec{k}_f - \vec{k}_i. \quad (3.55)$$

Die Wechselwirkung zwischen dem Neutron am Ort \vec{r} und einem Atomkern am Ort \vec{R}_i lässt sich, wie in Tabelle 3.1 vorgestellt, über ein Fermi-Pseudopotential beschreiben als [16]:

$$V(\vec{r}) = \frac{2\pi\hbar^2}{m} b_i \delta(\vec{r} - \vec{R}_i). \quad (3.56)$$

b_i ist hierin die Streulänge. Aus dem Fermi-Pseudopotential geht hervor, dass die Wechselwirkung kurzreichweitig ist.

Der Wechselwirkungs-Hamiltonoperator \hat{H}_c zwischen einem Neutron und den Atomkernen i , der in die Gleichungen (3.3) und (3.5) eingeht, lautet:

$$\hat{H}_c = \frac{2\pi\hbar^2}{m} \sum_i b_i \delta(\vec{r} - \vec{R}_i). \quad (3.57)$$

Mit der Definition der Dichte als

$$\rho(\vec{r}, t) = \sum_i \delta(\vec{r} - \vec{R}_i(t)) \quad (3.58)$$

lässt sich Wechselwirkungs-Hamiltonoperator als Funktion der Kerndichte $\rho(\vec{r}, t)$, oder nach Fouriertransformation auch als $\hat{H}(\vec{q})$ schreiben

$$\hat{H}_c = \frac{2\pi\hbar^2}{m} b \rho(\vec{r}, t) \quad \text{und} \quad \hat{H}_c = \frac{2\pi\hbar^2}{mV} \rho_Q(t) \quad (3.59)$$

Dieser Hamiltonoperator wird in die Gleichungen (3.5) und (3.7) eingesetzt. Damit ergibt sich, dass die Messgröße der Neutronenstreuung proportional zur Dichtekorrelationsfunktion ist.

Die Streulänge b ist isotrop und unabhängig von der Neutronenergie, jedoch spezifisch für jedes Isotop. Die Streulänge kann in einen inkohärenten und einen kohärenten Anteil aufgespalten werden. Bei der Untersuchung von Protein-Wasser-Gemischen dominiert der inkohärente Anteil der Streuung, da Protonen einen viel größeren inkohärenten Streuquerschnitt haben, als die übrigen in der Probe vorkommenden Isotope. Die ist aus Tabelle 3.2 ersichtlich, in der die Werte von b_i für die wichtigsten biologischen Isotope zusammengestellt sind.

Eine wichtige aus der Streulänge abgeleitete Größe ist der Streuquerschnitt σ

$$\sigma = \sigma_{coh} + \sigma_{inc} = 4\pi \langle b \rangle^2 + 4\pi \langle (b - \langle b \rangle)^2 \rangle. \quad (3.60)$$

Dieser geht in die Messgröße der Neutronenstreuung ein. Die Messgröße eines Neutronenstreuexperiments ist der doppeltdifferentielle Streuquerschnitt

$$\frac{\partial \sigma}{\partial \Omega \partial \omega} = \frac{k_f}{k_i} \frac{1}{2\pi} \sum_i \sum_j \int_{-\infty}^{\infty} \frac{1}{N} \langle b_i b_j \exp(i\vec{q} \cdot \vec{R}_i(t)) \exp(-i\vec{q} \cdot \vec{R}_j(0)) \rangle \exp(i\omega t) dt. \quad (3.61)$$

Er ist proportional zur Wahrscheinlichkeit, dass ein Neutron mit der Energie $E_i = \frac{\hbar^2 k_i^2}{2m_n}$ in den Raumwinkel Ω gestreut wird. Aus dem doppeltdifferentiellen Streuquerschnitt daraus wird meist unmittelbar der dynamische Strukturfaktor $S(\vec{q}, \omega)$ ermittelt. Zwischen den beiden Größen besteht die Beziehung

$$\frac{\partial \sigma}{\partial \Omega \partial \omega} = N \frac{k_f}{k_i} \left[\frac{\sigma_{coh}}{4\pi} S_{coh}(\vec{q}, \omega) + \frac{\sigma_{inc}}{4\pi} S_{inc}(\vec{q}, \omega) \right] \quad (3.62)$$

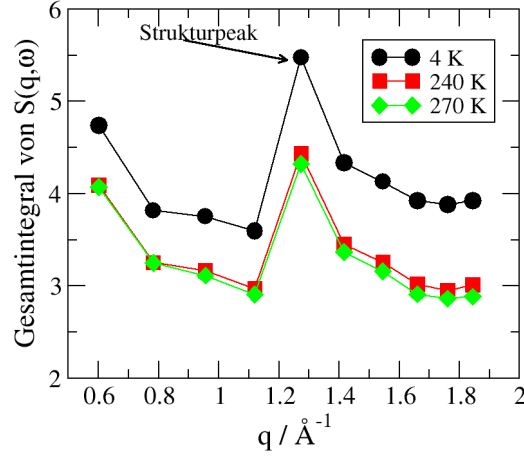


Abb. 3.9: Gesamtintensität der Streuung der Elastinprobe ELA_D2O ($h = 0.2 \text{ g/g}$) bei verschiedenen Temperaturen in Abhängigkeit des Streuvektors. Bei $q = 1.27 \text{ Å}^{-1}$ ist der Strukturpeak aufgrund der kohärenten Streuung zu erkennen.

Der dominierende Streubeitrag in den untersuchten Proteinproben in dieser Arbeit stammt aus der inkohärenten Streuung von Protonen. Somit ist der inkohärente dynamische Strukturfaktor $S^{inc}(q, \omega)$ relevant. Alle Auswertungen beziehen sich ausschließlich auf den inkohärenten Streubeitrag. Dabei wird in Kauf genommen, dass der kohärente Streubeitrag, den insbesondere die Deuteronen der teildeutierten Probe zur Streuung beitragen, vernachlässigt wird. Der Einfluss des kohärenten Streubeitrags ist in der streuvektorabhängigen Auftragung der Gesamtintensität in Abbildung 3.9 zu sehen. Hierin ist die Gesamtintensität im Fenster $\pm 30 \mu\text{eV}$ für verschiedene Temperaturen gezeigt. Bei allen Temperaturen ist ein Peak bei $q = 1.27 \text{ Å}^{-1}$ zu erkennen. Dieser sogenannte Strukturpeak rührt von kohärenter Streuung an Deuteronen her [18]. Um q -abhängige Größen konsistent auszuwerten, bleiben die Daten von $q = 1.27 \text{ Å}^{-1}$ unberücksichtigt (vgl. Abb. 3.12).

Der inkohärente dynamische Strukturfaktor ist, wie in Gleichung (3.16) vorgestellt, über eine räumliche und zeitliche Fouriertransformation mit dem Selbst-Anteil der Paarkorrelationsfunktion $G_s(r, t)$ verknüpft. $G_s(\vec{r}, t)$ gibt die Wahrscheinlichkeit an, ein Teilchen i zu einem Zeitpunkt t in einem Abstand r zu seinem Aufenthaltsort \vec{R}_i zur Zeit $t = 0$ zu finden [16]

$$G_s(\vec{r}, t) = \frac{1}{N} \sum_i \int d\vec{r}' \langle \delta [\vec{r} - (\vec{r}' - \vec{R}_i(0))] \delta [\vec{r}' - \vec{R}_i(t)] \rangle. \quad (3.63)$$

Durch eine räumliche Fouriertransformation wird aus der Paar-Korrelationsfunktion die intermediäre Streufunktion $S(\vec{q}, t)$ erhalten:

$$S^{inc}(\vec{q}, t) = \int d^3r \exp(i\vec{q}\vec{r}) G_s(\vec{r}, t). \quad (3.64)$$

Tab. 3.2.: Streuquerschnitte $\sigma = 4\pi b^2$ der für biologische Proben wichtigsten Isotope in 10^{24} cm

Isotope	b_{coh}	b_{inc}
^1H	1.75	79.90
^2H	5.60	2.04
^{12}C	5.56	0.00
^{14}N	11.03	0.49
^{16}O	4.24	0.00

Der inkohärente dynamische Strukturfaktor $S^{\text{inc}}(q, \omega)$ lässt sich folglich mit Hilfe der beiden Korrelationsfunktionen $G_s(\vec{r}, t)$ und $S(\vec{q}, t)$ wie folgt darstellen:

$$S^{\text{inc}}(\vec{q}, \omega) \propto \int_{-\infty}^{\infty} S(\vec{q}, t) \exp(-i\omega t) dt \quad (3.65)$$

$$\propto \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} G_s(\vec{r}, t) \exp(i\vec{q}\vec{r}) \exp(i\omega t) d\vec{r} dt. \quad (3.66)$$

Im Folgenden wird der Index „inc“ für die inkohärente Streufunktion weggelassen. Die Streufunktion lässt sich in einen elastischen und einen inelastischen Anteil zerlegen

$$S(q, \omega) = S_{\text{el}}(q, \omega = 0) + S_{\text{inel}}(q, \omega). \quad (3.67)$$

Für den elastischen Anteil gilt:

$$I_{\text{el}} = S_{\text{el}}(q, \omega = 0) \propto \int_{-\infty}^{\infty} S(q, t \rightarrow \infty) \exp(-i\omega t) dt. \quad (3.68)$$

Gleichung (3.67) wird wegen Gleichung (3.65) somit zu:

$$S(q, \omega) = S_{\text{el}}(q, t \rightarrow \infty) \delta(\omega) + S_{\text{inel}}(q, \omega). \quad (3.69)$$

Der elastische Anteil kann jedoch nicht beliebig genau gemessen werden. Jedes Spektrometer besitzt eine begrenzte Energieauflösung $\Delta\omega$. Diese wird durch die Auflösungsfunktion $R(\omega; \Delta\omega)$ beschrieben, welche häufig als gaußförmig genähert werden kann. Der gemessene Strukturfaktor $S_R(q, \omega; \Delta\omega)$ ist dann eine Faltung des tatsächlichen Strukturfaktors $S(q, \omega)$ mit der Auflösungsfunktion [178]:

$$S_R(q, \omega; \Delta\omega) = S(q, \omega) \otimes R(\omega; \Delta\omega) \quad (3.70)$$

$$= \int_{-\infty}^{\infty} S(q, t) R(t) \exp(-i\omega t) dt. \quad (3.71)$$

Diese Zusammenhänge müssen bei der Auswertung der Daten berücksichtigt werden. Darauf wird in Kapitel 3.3.3 näher eingegangen. Im folgenden Kapitel wird das verwendete Spektrometer SPHERES vorgestellt.

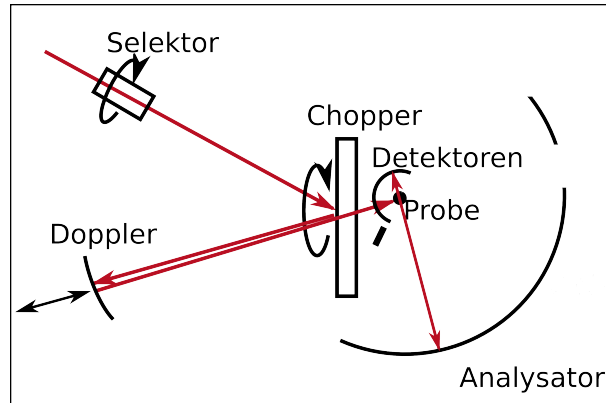


Abb. 3.10: Schematischer Strahlengang am Rückstreu-spektrometer SPHERES am FRM II in München.

3.3.2 Neutronenstreuung am Rückstreu-spektrometer SPHERES

Die Messungen in dieser Arbeit wurden an einem Rückstreu-spektrometer durchgeführt. Rückstreu-spektrometer zeichnen sich durch eine hohe Energieauflösung aus. Der Nachteil dieser Spektrometer ist ein niedriger Neutronenfluss und dadurch lange Messzeiten für ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis [138].

Die hohe Auflösung wird durch Ausnutzung eines Streuprozesses um 180° von Neutronen, der Rückstreuung, erzielt. Ein Neutron wird an einem Gitter, z.B. einem Monochromator, gestreut, wenn es die Bragg-Bedingung

$$\lambda = 2d \sin(\theta) \quad (3.72)$$

erfüllt. Der Abstand d ist durch den Abstand der Monolagen im Monochromatormaterial vorgegeben. Als Monochromator kommt häufig Si(111) zum Einsatz. Die Neutronen treffen im Winkel von 90° auf den Silizium-Einkristall und werden reflektiert. Dass dadurch die hohe Energieauflösung erreicht wird, lässt sich durch Ableitung der Bragg-Gleichung (3.72) verdeutlichen

$$\frac{\Delta E}{E} = \frac{2\Delta\lambda}{\lambda} = 2 \cot \theta \Delta\theta + \frac{2\Delta d}{d}. \quad (3.73)$$

Für $\theta = 90^\circ$ wird der erste Summand minimiert, so dass die Energieauflösung $\frac{\Delta E}{E}$ durch die recht kleine Unregelmäßigkeit $\Delta d/d$ des Monochromator-Kristalls bestimmt wird.

Die hier vorgestellten Messungen wurden am Rückstreu-spektrometer SPHERES am Forschungsreaktor II in München durchgeführt. Die Abkürzung steht dabei für: Spectrometer for high energy resolution.

Die Funktionsweise des Spektrometers lässt sich mit Hilfe von Abbildung 3.10 beschreiben. Der Messprozess geschieht in drei Schritten: (1) Energie- und Wellenvektorauswahl der Neutronen, (2) Streuung an der Probe, (3) Analyse der Neutronen gemäß Energie und Winkel.

Für SPHERES läuft dies wie folgt ab: Die im Reaktor erzeugten und anschließend thermalisierten Neutronen werden zum Spektrometer hin geleitet. Dort passieren alle Neutronen mit geeignetem Einfallswinkel den Beamstopper. Im Selektor werden die Neutronen geschwindigkeitsselektiert. Dies geschieht durch versetzt montierte Schlitzräder, die nur jene Neutronen passieren lassen, deren Geschwindigkeit einen kontinuierlichen Flug erlaubt.

Im Anschluss treffen die Neutronen auf ein Phasenraum-Transformations-Flügelrad (engl. phase space transformation chopper). Dies ist ein Flügelrad, an dem zeitperiodisch ein Teil des Strahls reflektiert wird und auf einen Monochromator gelenkt wird. Das Funktionsprinzip des Phasenraum-Transformations-Chopper ist in [138] ausführlich dargelegt. Am Monochromator wird das Neutron wie oben beschrieben um 180° gestreut. Die Energie der einfallenden Neutronen wird dadurch variiert, dass der Monochromator auf einem Linearschrittmotor sitzt

$$\Delta E = E_m - E_0 = \pm 2E_0(\nu_m/\nu_0). \quad (3.74)$$

mit $E_0 = 2.08 \text{ meV}$ und $\nu_0 = 630.8 \text{ m/s}$. ν_m ist die Geschwindigkeit des Monochromators. Nur solche Neutronen, deren Geschwindigkeit der Monochromatorgeschwindigkeit entspricht, können demnach reflektiert werden. Deshalb wird dieser erste Monochromator auch Doppler genannt.

Die Neutronen passieren nun zeitperiodisch ungehindert den Phasenraum-Transformations-Chopper und treffen auf die Probe. Hier werden sie gestreut. Bei der Streuung können Energie und Impuls der Neutronen verändert werden.

Die gestreuten Neutronen fliegen auf statische Monochromatoren, sogenannte Analytoren, und nur solche Neutronen können die Bragg-Bedingung erfüllen, die bei der Streuung an der Probe ihre Energie um den Dopplerbeitrag verändert haben. Anschließend passieren die Neutronen die Probe ein zweites Mal und werden schließlich unter einem Winkel der für kleine Energieüberträge gemäß [44]

$$q = \left(\frac{4\pi}{\lambda} \right) \sin \left(\frac{\phi}{2} \right) \quad (3.75)$$

vom Streuvektor abhängt, detektiert. Das Spektrometer deckt einen q -Bereich von 0.2 - 1.9 \AA^{-1} ab. Der Streuvektorbereich 0.2 - 0.5 \AA^{-1} wird dabei von Kleinwinkeldetektoren erfasst. Größere Streuvektoren werden von den zuverlässigeren Großwinkeldetektoren gemessen. Die Kleinwinkeldetektoren sind aus messtechnischen Gründen [283] weniger einfach zu evaluieren (vgl. Abb. 3.11(b)) und bleiben entweder unberücksichtigt,

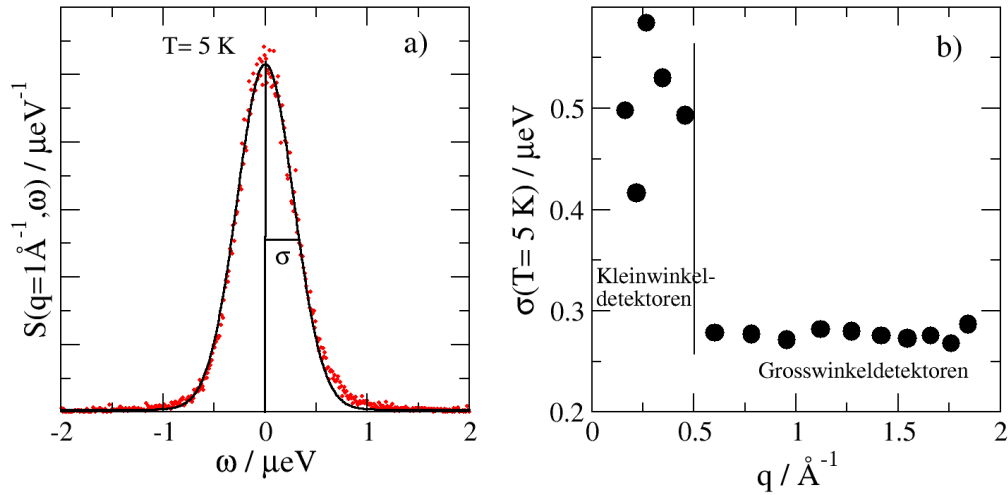


Abb. 3.11: a) Spektrum bei $q = 0.96\text{Å}^{-1}$ (Punkte) mit Gaußfit (Linie) b) Breite des Spektrums bei 5 K als Funktion des Streuvektors.

oder müssen separat betrachtet werden. In dieser Arbeit wurden die Kleinwinkeldetektoren nicht weiter berücksichtigt.

Die Auslenkung des Linearschrittmotors beträgt ca. 15 cm, seine höchste Geschwindigkeit etwa 30 m/s. Daraus ergibt sich eine maximale Energievariation des Experiments von $\pm 30\mu\text{eV}$.

Im vorliegenden Spektrometer wurde die Auflösungsfunktion bestimmt, indem Spektren bei $T = 5\text{ K}$ mit einer Gaußfunktion angefitet wurden. Die Daten für $q = 0.96\text{Å}^{-1}$ und ein Fit sind beispielhaft in Abbildung 3.11(a) gezeigt. Die Gaußbreite ist in Abbildung 3.11(b) aufgetragen. Aus der Breite der Gaußkurve $\sigma_G = 0.27\text{meV}$ lässt sich über $\text{FWHM} = \sqrt{8\ln 2}\sigma_G$ die volle Breite bei halbem Maximum (FWHM) des Spektrums ermitteln. Daraus lässt sich das Zeitauflösung des Experiments zu $\tau_{res} = 2\hbar\sqrt{\ln(2)}/\text{FWHM}$ bestimmen [283]. Folglich beträgt das Zeitfenster des Experiments $\tau_{res} = 1.74\text{ns}$.

Weitere Eigenschaften dieses Spektrometers sind in Tabelle 3.3 im Vergleich zu den Daten des Rückstreu-spektrometers IN16 am Institut Laue Langevin (ILL) in Grenoble³ angegeben. Das Spektrometer SPHERES zeichnet sich insbesondere durch die hohe Energieauflösung und das gute Signal-zu-Rausch-Verhältnis aus [282].

Detaillierte Informationen zum verwendeten Spektrometer SPHERES sind in dem Artikel von Wuttke et al. [282] zu finden.

³ <https://www.ill.eu/instruments-support/instruments-groups/instruments/in16b/characteristics/>, zuletzt besucht 03.11.2014

Tab. 3.3.: Vergleichende Zusammenstellung der Eigenschaften der Rückstreu-spektrometer SPHERES und IN16

Eigenschaft	SPHERES	IN16
Wellenlänge	6.271 Å	6.271 Å
Energieauflösung (FWHM)	0.62 μeV	0.85 μeV
Zeitfenster	1.74 ns	1.28 ns
Energiebereich	$\pm 30 \mu\text{eV}$	$\pm 31 \mu\text{eV}$
q -Bereich	0.2-1.8 Å ⁻¹	0.1-1.8 Å ⁻¹

3.3.3 Messungen und Details zur Auswertung

Zwei verschiedene Arten der Messung wurden durchgeführt: Spektrenmessungen und quasielastische Temperaturscans. Die Auswertung der Messdaten wurde mit dem Programm FRIDA [281] durchgeführt.

Spektren

Bei drei Temperaturen wurden Spektren im vollen Energiebereich des Spektrometers $\Delta\omega = \pm 30 \text{ meV}$ aufgenommen: $T = 5, 240, 270 \text{ K}$. Die Datenakkumulation erfolgte jeweils für 12 Stunden.

Bei der Anpassung der Spektren wird die Auflösungsfunktion $R(\omega; \Delta\omega)$ des Spektrometers gemäß Gleichung (3.71) berücksichtigt. Das Spektrum setzt sich zusammen aus der Hintergrundstreuung p_{bg} , dem elastischen Anteil p_1 , der einer δ -Funktion mit der Auflösungsfunktion, sowie dem quasielastischen Anteil p_2 , der durch eine Modellfunktion $f_{\text{Modell}}(\omega)$ ebenfalls gefaltet mit der Auflösungsfunktion beschrieben wird, so dass der Aufbau einer Fitfunktion in Frida prinzipiell lautet:

$$p_{bg} + p_1(\delta(\omega) \otimes R(\omega; \Delta\omega)) + p_2(f_{\text{Modell}}(\omega) \otimes R(\omega; \Delta\omega)). \quad (3.76)$$

Zum Fitten der Spektren wurde als Auflösungsfunktion das Spektrum bei der tiefsten Temperatur herangezogen.

Quasielastische Temperaturscans

Um einen Überblick über die Dynamik zu erhalten wurden Spektren mit geringer Akkumulationszeit im Temperaturbereich 4-300 K und im Energiebereich $\pm 3 \mu\text{eV}$ aufgenommen. Dabei wurde der Doppler mit einer geringen Geschwindigkeit bewegt, während gleichzeitig die Temperatur innerhalb von 24 h kontinuierlich im angegebenen Temperaturbereich erhöht wurde. Anschließend wurden die Daten über jeweils einen Temperaturbereich von ca. 4 K zusammengefasst.

Für jedes Temperaturintervall von $\Delta T = 4 \text{ K}$ kann so das Spektrum in einem kleinen Energiebereich gewonnen werden. Dieses Verfahren kann genutzt werden, um aus der Veränderung der elastischen Intensität als Funktion der Temperatur jene Temperaturbereiche zu identifizieren, in denen sich die Dynamik der Probe deutlich ändert.

Die Spektren weisen eine detektor- und temperaturabhängige Verschiebung um den Nullpunkt herum auf. Um diese zu korrigieren, werden die Spektren im Energiebereich $\pm 0.75 \mu\text{eV}$ mit einer Gaußkurve gefittet und die Daten um die so bestimmte Nullpunktverschiebung korrigiert.

Anschließend werden die Spektren auf die tiefste Temperatur normiert. Hierzu werden die elastischen Intensitäten $I_{el}(\omega = 0, T)$ auf den Mittelwert der elastischen Intensität des Bereichs 5-35 K normiert.

Mit diesen Daten wurde das mittlere Verschiebungsquadrat wie im Folgenden beschrieben evaluiert.

Bestimmung des mittleren Verschiebungsquadrat

Das mittlere Verschiebungsquadrat wird als anschauliche Größe extrahiert, um einen Überblick über die dynamischen Prozesse in Abhängigkeit von der Temperatur zu bekommen [87]. Das mittlere Verschiebungsquadrat wird aus der elastischen Intensität der quasielastischen Temperaturscans gewonnen.

In der Herleitung des MSD wird von einer Vibrationsbewegung der Atome um feste Gitterpunkte ausgegangen. Für die Paarverteilungsfunktion G_s (s. Gl. (3.63)) wird eine isotrope Gaußverteilung angenommen. Damit ergibt sich für die elastische Intensität $I_{el}(q, T)$ [60]:

$$I_{el}(q, T) \approx 1/3 \exp(-q^2 \langle r^2 \rangle_{\tau_{res}}). \quad (3.77)$$

Dies entspricht gemäß Gleichung (3.69) dem elastischen Streubeitrag des dynamischen Strukturfaktors, gefaltet mit der Auflösungsfunktion.

Aus den gemessenen Daten wird das MSD nach Normierung auf das Tieftemperaturspektrum durch linearen Fit der normierten elastischen Intensität als Funktion von q^2 gewonnen.

$$-\ln \left[\frac{I_{el}(q, T)}{I_{el}(q, T = 4 \text{ K})} \right] = \frac{\langle r^2 \rangle}{3} q^2. \quad (3.78)$$

Die Auswertung ist in Abbildung 3.12 veranschaulicht. In Abbildung 3.12(a) sind die Daten der elastischen Intensität gemäß der rechten Seite von Gleichung 3.78 normiert und als Funktion von q^2 aufgetragen. Aus der Steigung des linearen Fits dieser Auftragung wird der Wert des MSD bei einer Temperatur gewonnen. Den temperaturabhängigen Verlauf des MSD zeigt Abbildung 3.12(b).

In der Auswertung wird davon ausgegangen, dass das Neutron genau einmal gestreut wird. Mehrfachstreuung wird nicht berücksichtigt. Dies kann zu quantitativen Fehlern z.B. einer Unterschätzung des MSD führen [288].

Die Gaußnäherung ist strenggenommen nur für Atome in idealen Gasen gültig. Abweichungen können außer durch nichtgaußsches Verhalten auch durch das Ensemblemittel über unterschiedliche gaußsche Propagatoren verschiedener Atome [65] zu

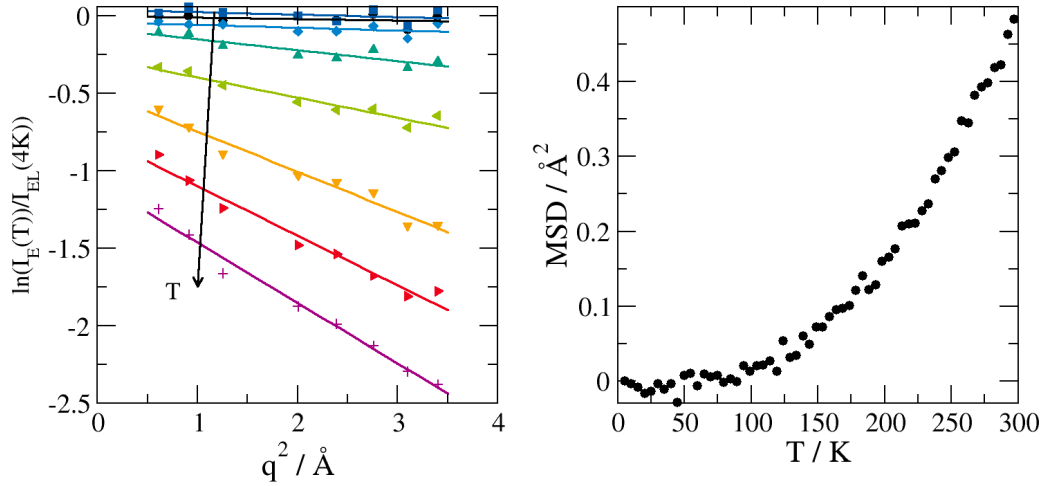


Abb. 3.12: a) Zur Berechnung des MSD wird die der Logarithmus der elastische Intensität normiert auf die I_{el} bei 4 K gegen q^2 aufgetragen (vgl. Gl.(3.78)). Die durchgezogenen Linien sind lineare Fits an die Daten. b) Mittleres Verschiebungsquadrat aus der Steigung der Fits in a).

Stande kommen. Die Gültigkeit der Gaußnäherung für Proteinpulver wurde beispielsweise von Hayward et al. untersucht [106]. Diese Autoren fanden, dass die Gaußnäherung für kleine Auslenkungen $\langle r^2 \rangle < 1 \text{ Å}^2$ gut erfüllt ist.

Die Ergebnisse der Neutronenstreuexperimente sind in Kapitel 7 vorgestellt. Der nächsten Abschnitt behandelt die Methode der MD-Simulationen.

3.4 Molekulardynamik-Simulationen

Die vorgestellten experimentellen Techniken liefern mittels ensemblegemittelter Größen Informationen über das untersuchte System. Molekulardynamik(MD)-Simulationen eröffnen einen detaillierteren Blick. Statt ensemblegemittelter Observablen, können aus MD-Simulationen die Verteilungen und Zeitreihen der Observablen aus den Einzeltrajektorien aller simulierter Atome bestimmt werden [266]. Darüber hinaus ist aber auch die Berechnung der im Experiment gemessenen Größen möglich.

In diesem Abschnitt soll nun das Funktionsprinzip der MD-Simulationen kurz erläutert werden. Anschließend werden die verwendeten Observablen eingeführt.

Weitergehende Informationen zu MD-Simulationen sind in [29, 265, 266] zu finden.

3.4.1 Grundlegendes Funktionsprinzip

Ziel der Simulationen ist es, eine Abbildung der Bewegung aller Atome eines Systems zu erreichen. Dazu müssten die Aufenthaltsorte aller Atomkerne und Elektronen durch näherungsweise Lösung der Schrödingergleichung ermittelt werden. Diese detaillierten Beschreibung aller Atome ist für kleine Systeme und für kurze Zeiten mit *ab-initio* Simulationen möglich. Für größere Systeme und längere Zeiten übersteigt diese Aufgabe jedoch die zugänglichen Lösungsverfahren und auch die Rechenleistung beträchtlich. In MD-Simulationen können längere Zeiten und größere Systeme simuliert werden, in dem das System klassisch betrachtet wird.

In MD-Simulationen werden die klassischen Newtonschen Bewegungsgleichungen für jedes Teilchen i iterativ gelöst

$$\vec{F}_i(t) = m_i \frac{\partial^2 \vec{r}_i}{\partial t^2} = \vec{\nabla}_i V. \quad (3.79)$$

Die Kräfte $\vec{F}_i(t)$, die auf jedes Teilchen der Masse m_i am Ort \vec{r}_i wirken, lassen sich dabei aus dem Potential V ableiten.

$$\vec{F}_i = -\frac{\partial V}{\partial \vec{r}_i}. \quad (3.80)$$

Eine MD-Simulation besteht aus folgenden Schritten:

1. Startpunkt sind die Positionen aller Atome \vec{r}_i . Daraus ergeben sich die zwischen den Atomen wirkenden Kräfte aus dem verwendeten Kraftfeld
2. Die Kräfte werden berechnet
3. Die Teilchenpositionen werden gemäß der auf sie während des Zeitschritts der Länge Δt wirkenden Kraft verschoben.
4. Die Trajektorie wird gespeichert

Diese Schritte 2-4 werden wiederholt, bis eine Trajektorie der gewünschten Länge erzeugt ist.

Die zwischen den Teilchen wirkenden Kräfte werden durch empirische Kraftfelder festgelegt. In diesen sind die für intra- und intermolekularen Wechselwirkungen parametrisiert:

$$V(\vec{r}) = \underbrace{\sum_{\text{Bindungen}} V^b(\vec{r}_{ij}) + \sum_{\text{Winkel}} V^w(\theta_{ijk}) + \sum_{\text{Dieder}} V^d(\phi_{ijkl})}_{\text{intramolekulare Wechselwirkung}} + \underbrace{\sum_{i < j} V^Q(\vec{r}_{ij}) + \sum_{i < j} V^C(\vec{r}_{ij})}_{\text{intermolekulare Wechselwirkung}}. \quad (3.81)$$

Die intermolekularen Wechselwirkungen sind langreichweitig. Diese Eigenschaft führt zu zwei Schwierigkeiten. Erstens: Bei der Betrachtung von paarweisen Wechselwirkungen über einen großen Abstand hinweg, müssen mit steigendem Abstand immer mehr Teilchen in die Berechnung der Kraft auf ein Atom einbezogen werden. Die Rechenzeit steigt. Die zweite Frage ist, wie die über die Grenzen des simulierten Systems hinausgehenden Wechselwirkungen berücksichtigt werden müssen. Der ersten Schwierigkeit wird durch Einführen von Cut-off-Parametern für die langreichweitigen Wechselwirkungen begegnet. Die zweite Schwierigkeit wird gelöst, indem sogenannte periodische Randbedingungen in den Simulationen eingesetzt werden. Das bedeutet, dass jedes simulierte System von den eigenen Abbildern umgeben ist. Ein Atom am Rand der Simulationsbox spürt folglich die Wechselwirkung mit den Atomen am gegenüberliegenden Ende der Simulationsbox⁴ und ungewollte Grenzflächeneffekte werden so vermieden. Nachteil dieser Methode ist, dass langreichweitige Korrelationen eingeführt werden.

Die Kraftfeldparameter für Simulationen von biologischen Makromolekülen werden wie folgt gewonnen: Zunächst werden kleine Moleküle, wie einzelne Aminosäuren, mit einer Vielzahl an verschiedenen Methoden⁵ charakterisiert, z.B. Bindungslänge, Bindungswinkel, Partialladung. Aus der Kombination der Methoden werden konsistente Parameter extrahiert und durch Berechnung der experimentellen Messgrößen kalibriert. Im zweiten Schritt werden die so für kleine Moleküle gewonnen Parameter daraufhin getestet, ob sie auch Struktur und Dynamik größerer Moleküle wiedergeben können. Dazu kann z.B. der Vergleich berechneter Strukturen von Peptiden mit Kern-Overhauser-Parametern aus der NMR-Spektroskopie herangezogen werden. Liefern diese Tests konsistente Ergebnisse, so wird das Kraftfeld zur Simulation auch von größeren Biomolekülen herangezogen [266].

Aus den Simulationen sollen Informationen über statische und dynamische Eigenschaften eines Systems im Gleichgewicht gewonnen werden. Vor dem Start einer Simulation muss daher eine Äquilibration durchgeführt werden. Diese kann bezüglich verschiedener Ensembles durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das System zunächst bei einem konstanten Druck von 1 bar im NPT-Ensemble äquilibriert und anschließend bei konstanter Temperatur im kanonischen NVT simuliert.

Die Ankopplung des Drucks bzw. der Temperatur an das Ensemble erfolgt über Thermostate und Barostate. Für die Temperaturankopplung wurde der Nosé-Hover-Thermostat [117, 199] und für die Druckankopplung der Parrinello-Rahman-Barostat [208] verwendet.

⁴ Die Summierung paarweisen Wechselwirkungen erfolgt in den hier verwendeten Simulationen nach der Gittersummen-Methode Particle-Mesh-Ewald [70].

⁵ zum Einsatz kommen hier u.a.: Röntgenstreuung zur Bestimmung der Bindungslänge, IR-Spektroskopie, zur Charakterisierung der Kraftkonstante der Bindung, und darüber hinaus die Bestimmung von thermodynamischen Daten, wie der Verdampfungswärme und der freien Solvationsenthalpie, sowie quantenchemische Berechnungen [266].

3.4.2 Simulation von Proteinen

Zur Simulation der Proteindynamik wurden die Kraftfelder Gromos96 43a2 [110]⁶ und OPLS-AA [126, 127] verwendet. Das erstgenannte ist dabei ein sogenanntes United-Atom-Kraftfeld, das Gruppen von Atomen zusammenfasst und gemeinsam parametrisiert. So werden beispielsweise die CH, CH₂ und CH₃-Gruppen statt mit 2, 3 bzw. vier Atomen wie nur ein Atom behandelt. Dadurch wird Rechenzeit und Speicherplatz gespart. Um die MD-Simulationen für verschiedene Subensembles der Protonen, die in Neutronenstreuung und mit NMR-Spektroskopie auflösbar sind, auszuwerten, wurden darüber hinaus noch Simulationen mit einem Kraftfeld für alle Atome, OPLS-AA (OPLS = optimized potentials for liquid simulations), durchgeführt.

Den jeweiligen Empfehlungen folgend wurden die zu den Proteinkraftfeldern optimalen Wassermodele gewählt. Das ist das SPC-Wassermodele [19] im Fall des GROMOS Potentials und das TIP4P-Modell [125] gemeinsam mit dem OPLS-AA-Kraftfeld. Auf die Unterschiede der verwendeten Wassermodele soll hier nicht eingegangen werden. Einen guten Überblick über den Aufbau und die Unterschiede der verschiedenen Wassermodele mit Verweis auf über 2000 Artikel zur Wasserstruktur- und dynamik gibt die Webseite von Martin Chaplin [38]. In der Bachelorarbeit von Arbeit von Jens Behrendt [17] wurde der Einfluss der Wahl des Wassermodeles auf die Dynamik des Wassers an einer Proteinoberfläche untersucht und es wurden quantitative, aber keine qualitativen Unterschiede festgestellt.

Eine wichtige Frage, die sich bei der Simulation von Proteinen stellt, ist die Frage nach der Ergodizität der Simulationen. Nimmt das Protein im Verlauf der Simulation alle möglichen Gleichgewichtskonformationen ein, so dass das Zeitmittel über ein Protein dem Ensemblemittel bei einem Zeitpunkt entspräche? Hinsichtlich aller möglichen Konformationen des Proteins ist dies sicher nicht der Fall, dafür müsste sich das Protein mehrmals entfalten und wieder falten, was mit MD-Simulationen ohne weitergehende Vergrößerung heute noch nicht möglich ist [266]. Sind jedoch wie in der vorliegenden Arbeit lediglich Gleichgewichtskonformationen von Interesse, ist dies nicht unbedingt notwendig.

Eine Studie von Genheden et al. zeigte, dass in Simulationen der Länge 500 ns 50-70 % des Konfigurationsraumes besichtigt werden [91]. Darin stellten sie fest, dass es nicht möglich ist, Simulationen von Proteinen nach Schiferl [233] so zu äquilibrieren, dass die aus den Trajektorien berechnete Entropie zeitunabhängige Werte für Mittelwert und Varianz aufweist. Dieser Beobachtung widerspricht eine neuere Studie [109], in der die Entropie aus den Krafttrajektorien, statt der Koordinatentrajektorien gewonnen wird.

⁶ Die Umstellung auf eine neuere Version des Kraftfeldes wurde abgewogen, hätte aber keine entscheidenden Veränderung für die vorliegende Simulation des Elastins ergeben [200].

Tab. 3.4.: Übersicht über die simulierten Systeme. Das verwendete Kraftfeld ist Gromos96 43a2. Für das mit * gekennzeichnete System wurde die Kombination OPLS-AA mit TIP4P Wasser verwendet, bei der Simulation des mit ** gekennzeichneten Systems wurde statt SPC Wasser SPC/E-Wasser eingesetzt.

System	Name	Parameterbereich
8 Elastin mit $h = 0.3 \text{ g/g}$	8ELA	$T = 200 - 370 \text{ K}$
8 Elastin mit $h = 0.3 \text{ g/g}^*$	8ELA-AA	$T = 4 - 370 \text{ K}$
1 Elastin mit $h = 9.2 \text{ g/g}$	1ELA	$T = 170 - 370 \text{ K}$
1 Elastin bei $T_{\text{Protein}} = 300 \text{ K}$	WTemp	$T_{\text{Wasser}} = 100 - 370 \text{ K}$
1 Elastin bei $T = 300 \text{ K}$	Hyd	$h = 0.3 \text{ g/g} - 9.2 \text{ g/g}$
4 Myoglobin mit $h = 0.3 \text{ g/g}^{**}$	MYO	$T = 200 - 300 \text{ K}$

In der vorliegenden Arbeit wird davon ausgegangen, dass die simulierten Systeme äquilibriert sind, wenn das umgebende Wasser äquilibriert ist. Für Simulationen bei Temperaturen $T < 200 \text{ K}$ wurde das System nicht mehr vollständig äquilibriert, da die Relaxationszeiten des Wassers zu lang werden.

Simulationsartefakte können bei der Simulation von Proteinen entstehen, wenn nur ein Makromolekül umgeben von Lösemitteln in einer Box vorliegt [252]. Das simulierte System entspricht dann im Fall eines Proteins einem Proteinkristall und weist Unterschiede zu einem hydratisierten Proteinpulver auf [252]. Um diese Simulationsartefakte zu vermeiden, werden in der vorliegenden Arbeit von allen Systemen Simulationen mit mehr als einem Proteinmolekül in der Box durchgeführt. Die Proteinmoleküle sind dabei in unterschiedlichen Startkonfigurationen äquilibriert.

Simulierte Systeme

In dieser Arbeit wurde die Dynamik von niedrighydratisierten Proteinen untersucht. Die simulierten Proteine waren Elastin und Myoglobin. Mehr zu Struktur und Funktion der beiden Proteine wird in Kapitel 4 vorgestellt. Die Erstellung der Myoglobin-Simulationen wurde im Rahmen der Masterarbeit von Felix Klameth durchgeführt [139]. Ausgehend von den bestehenden Simulationen wurden weitere Kurzzeitsimulationen durchgeführt. Einen Überblick über die simulierten Systeme gibt Tabelle 3.4.

3.4.3 Observablen

Aus den MD-Simulationen wurden verschiedene Observablen gewonnen, die nachfolgend vorgestellt werden sollen. Dabei handelt es sich einerseits um Größen, die auch in den experimentellen Methoden gemessen werden, wie die Orientierungs-Autokorrelationsfunktion F_2 in den Stimulierten-Echo-Messungen und das mittlere Verschiebungsquadrat sowie die intermediäre inkohärente Streufunktion in der Neutronenstreuung. Darüber hinaus werden andererseits mikroskopische Informationen mittels des Potentials, der van Hove-Funktion für Rotation und Translation und von bedingten Wahrscheinlichkeitsfunktion gewonnen.

Translationsbewegungen können mit der inkohärenten intermediäre Streufunktion $S(\vec{q}, t)$ betrachtet werden. Der Betrag des Streuvektors $|\vec{q}| = q$ gibt Aufschluss über die betrachtete Längenskala der Bewegung. Die Näherung ist für den Fall isotroper Systeme gültig, die Herleitung ist in [29] angegeben

$$I(\vec{q}, t) = \langle \cos(\vec{q} \cdot [\vec{r}_i(t_0 + t) - \vec{r}_i(t_0)]) \rangle \approx \left\langle \frac{\sin(q|\vec{r}_i(t) - \vec{r}_i(t_0)|)}{q|\vec{r}_i(t) - \vec{r}_i(t_0)|} \right\rangle. \quad (3.82)$$

Soweit nicht anders angegeben, werden die Stickstoffatome des Proteinrückgrats für die Auswertung der Proteindynamik und das Sauerstoffatom der Wassermoleküle zur Auswertung der Wasserdynamik herangezogen. Die Längenskala wird üblicherweise am oder nahe des Maximum der Paarverteilungsfunktion von Wasser bei $q = 0.22 \text{ nm}^{-1}$ gewählt.

Die Orientierungsautokorrelationsfunktion F_2 wird wie folgt berechnet:

$$F_2(t) = \frac{1}{2} \langle 3[\vec{e}_i(t_0 + t) \cdot \vec{e}_i(t_0)]^2 - 1 \rangle. \quad (3.83)$$

$\vec{e}(t)$ ist der Einheitsvektor entlang der betrachteten Bindung. Bei der Untersuchung der Proteindynamik werden häufig der C=O-Vektor oder auch der N-H-Vektor verwendet, da diese Bindungen am Proteinrückgrat sitzen und die Mobilität des Rückgrats widerspiegeln.

Sowohl die inkohärente intermediäre Streufunktion als auch die Orientierungskorrelationsfunktion fallen im Fall von einfacher Diffusion exponentiell ab. Komplexere Dynamik kann, wie in Kap. 2.2 eingeführt, zum Beispiel zu einem zweistufigen Abfall mit einem gestreckt-exponentiellen hinteren Abfall oder einem potenzgesetzartigen oder logarithmischen Zerfall der Korrelation führen.

Eine weitere aus den experimentellen Untersuchungen mittels Neutronenstreuung zugängliche Observable ist das mittlere Verschiebungsquadrat. Aus den Trajektorien der MD-Simulation wird es mittels

$$r^2(t) = \langle [\vec{r}_i(t_0 + t) - \vec{r}_i(t_0)]^2 \rangle \quad (3.84)$$

gewonnen. Als Funktion der Zeit ist bei kurzen Zeiten ein Anstieg mit t^2 zu erwarten, der ballistische Bereich. Daran schließt sich eine Zeitabhängigkeit von t^1 an, der diffusive Bewegung kennzeichnet. Für unterkühlte Systeme sind die beiden Zeitbereiche durch ein Plateau getrennt, das die Bewegungseinschränkung eines Atoms durch den Käfig der umgebenden Nachbarn markiert. Subdiffusive Dynamik zeichnet sich durch eine Zeitabhängigkeit von t^α mit $\alpha < 1$ aus.

Aufschluss über den Bewegungsmechanismus geben die van Hove-Funktionen für Rotation und Translation. Die van Hove-Translationsfunktion wird über folgende Beziehung ausgewertet:

$$G_s(\vec{r}, t) = \langle \delta \left[|\vec{r}_i(t_0 + t) - \vec{r}_i(t_0)| - r \right] \rangle. \quad (3.85)$$

Die Verteilungsfunktion $4\pi r^2 G_s(r, t)$ gibt die Wahrscheinlichkeit für ein isotropes System an, ein Atom i nach der Zeit t im Abstand r zu finden. Für eine stochastische Bewegung weist sie eine Gaußform auf.

Analog zur van Hove-Translationsfunktion kann eine Wahrscheinlichkeitsfunktion für die Rotationsbewegung definiert werden:

$$p(\theta, t) = \langle \delta [\theta - \arccos(\vec{e}(t_0 + t) \cdot \vec{e}(t_0))] \rangle. \quad (3.86)$$

Sie gibt die Wahrscheinlichkeit dafür an, dass sich die Orientierung eines Vektors im Zeitintervall t um den Winkel θ geändert hat. Für lange Zeiten ergibt sich im Fall einer isotropen Reorientierung $p(\theta, t) \rightarrow \sin(\theta)$. Diese Observable wird für den C=O-Vektor oder alternativ für den N-H-Vektor im Proteinrückgrat ausgewertet. Zur Auswertung der Wasserdynamik wird eine O-H-Bindung herangezogen.

Aus der Wahrscheinlichkeitsverteilung ein Atom an einem Ort $|\vec{x}|$ zu finden, kann das Potential der mittleren Kraft gefunden werden.

$$U(x - x_0) = -k_B T \ln(P(x - x_0)). \quad (3.87)$$

In dieser Arbeit wird das Potential aus der Trajektorie in x-Richtung gemittelt über die gesamte Trajektorie bis zum angegebenen Zeitpunkt, wie in [185, 186] vorgestellt, verwendet.

Bei der Auswertung der Proteindynamik wird für Proteine eine subdiffusive Bewegung gefunden. Wie in Kapitel 2.2 eingeführt, lässt sich das subdiffusive MSD erklären, wenn eine Rückkorrelation in der Bewegung angenommen wird (vgl. Gl. (2.14)). Um Informationen über diese korrelierte Dynamik zu erhalten, wird statt einer Zwei-Zeiten-Korrelationsfunktion die Bewegung zu drei Zeiten, also in zwei Zeitintervallen, ausgewertet und korreliert. Die Observable ist das erste Moment der bedingten Wahrscheinlichkeitsfunktion $p(r_{23}|r_{12})$ [114]

$$\langle r_{23} \rangle(r_{12}) = \left\langle \vec{r}_{23} \cdot \frac{\vec{r}_{12}^j}{r_{12}^j} [\delta(r_{12}^j - r_{12})] \right\rangle. \quad (3.88)$$

Die Idee hinter dieser Größe ist in Abbildung 3.13 veranschaulicht. Ein Teilchen ändert im Zeitintervall t_{12} seine Position um \vec{r}_{12} . Es stellt sich die Frage, ob die Dynamik im darauffolgenden Schritt mit dem ersten Schritt korreliert ist. Dazu wird der im Zeitintervall t_{23} zurückgelegte Weg \vec{r}_{23} auf die Richtung von \vec{r}_{12} projiziert. Daraus kann die bedingte Wahrscheinlichkeitsfunktion $p(r_{23}|r_{12})$ ermittelt werden. Sie gibt die Wahrscheinlichkeit eine Strecke r_{23} im Zeitintervall t_{23} zu finden, wenn im ersten Zeitintervall die Strecke r_{12} zurück gelegt wurde.

Um $\langle r_{23} \rangle(r_{12})$ in Gleichung (3.88) zu erhalten, wird nun das Mittel über viele Zeitintervalle t_{23} gebildet. Im Fall einer unkorrelierten Bewegung wird als Mittelwert aller Projektionen $\langle r_{23} \rangle = 0$ erwartet. Rückkorrelierte Bewegungen, wie sie im Fall subdiffusiver Systeme erwartet werden, ergeben $\langle r_{23} \rangle < 0$, Vorwärtskorrelationen entsprechen $\langle r_{23} \rangle > 0$. Die Auswertung erfolgt als Funktion der im Zeitraum t_{12} zurückgelegten Strecke r_{12} . Liegt eine stochastische Dynamik in einem harmonischen Potential vor, dann gilt [114]

$$\langle r_{23} \rangle(r_{12}) = -1/2r_{12}. \quad (3.89)$$

Beispielrechnungen für weitere Potentiale sind in [114] durchgeführt. Diese Analyse erlaubt es, die Trajektorien auf rückkorrelierte Bewegung hin zu untersuchen.

Alle übrigen verwendeten Größen sind am Ort der Verwendung erläutert.

MD-Simulationen ermöglichen es folglich die Brücke zwischen den verschiedenen experimentellen Techniken zu schlagen, indem aus ihnen an einem simulierten System sowohl die Observablen der NMR-Spektroskopie als auch jene der Neutronenstreuung berechnet werden können. Darüber hinaus ist es möglich, Aufschluss über mikroskopische Ursachen der beobachteten Dynamik zu erhalten.

3.5 Vergleich der verwendeten Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden sind quasielastische Neutronenstreuung, ^2H -NMR-Spektroskopie und Molekulardynamik-Simulationen. In diesem Abschnitt sollen die mit diesen Methoden abgedeckten Zeit- und Längenbereiche, die Vor- und Nachteile der Methoden und die untersuchten Observablen zusammengestellt werden, um eine Einschätzung zu ermöglichen, inwiefern sich die Methoden überschneiden und wo sie sich ergänzen können.

Überblick über die zugänglichen Zeit- und Längenbereiche

Mit allen drei Methoden lassen sich Informationen über dynamische Prozesse erhalten. Die jeweils zugänglichen Längen- und Zeitskalen sind in Abbildung 3.14 dargestellt.

Die MD-Simulationen decken in dieser Darstellung den größten Längenbereich ab. Die in dieser Arbeit durchgeführten Simulationen haben eine Länge von 100 ns, und in dieser Zeit bewegen sich Wassermoleküle bei Raumtemperatur einige nm weit. Als untere Grenzen wurde 0.0001 nm gewählt. Dies entspricht etwa der kleinsten ermittelten Bewegung des Atomschwerpunkts, wenn die Vibrationen herausgemittelt werden (vgl. Abb. 5.15).

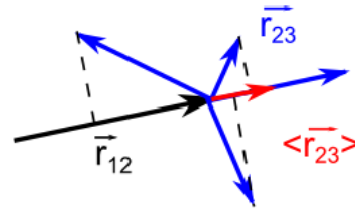


Abb. 3.13: Veranschaulichung zu Gleichung (3.88)

Die Zeit und Längenskala der quasielastischen Neutronenstreuung wurden, wie in Kapitel 3.3.2 für das Instrument SPHERES angegeben als $0.2 < q < 1.84 \text{ \AA}^{-1}$ und $\tau_{res} \approx 2 \text{ ns}$ gewählt. Die kleinste Zeitskala wurde entsprechend des messbaren Energiebereichs von $\pm 30 \text{ meV}$ zu ca. 4 ps angenommen. Diese Grenzen sind eine konservative Einschätzung. In der Datenanalyse werden zum Teil Zeitkonstanten für die Dynamik ermittelt, die sich zu längeren Zeiten hin erstrecken [40, 59].

Die Längenskaleneinstufung der ^2H -NMR-Spektroskopie erfolgte aufgrund der Tatsache, dass hier Bindungsreorientierungen gemessen wurden im Bereich von einer C-H Bindungslänge von 1 \AA . Die große abgedeckte Zeitskala wird durch den Einsatz der drei Experimente Spin-Gitter-Relaxationszeitmessungen, Spektrenmessungen und Stimulierte-Echo-Messungen zugänglich.

Hinsichtlich der Zeit- und Längenskalen gibt es zwischen den drei Methoden sowohl Überlapp, als auch eine gewisse Komplementarität. Während der Zeit- und Längenskalenbereich der QENS vollständig von der MD-Simulation umfasst wird, zeichnet sich die ^2H -NMR-Spektroskopie durch den großen abgedeckten Zeitbereich aus und ergänzt die beiden anderen Methoden.

Überblick über die Observablen

Einen Überblick über die Methoden und die gemessenen Funktionen zeigt Abbildung 3.15. Diese Abbildung veranschaulicht die in Kapitel 3.1 vorgestellten Zusammenhänge.

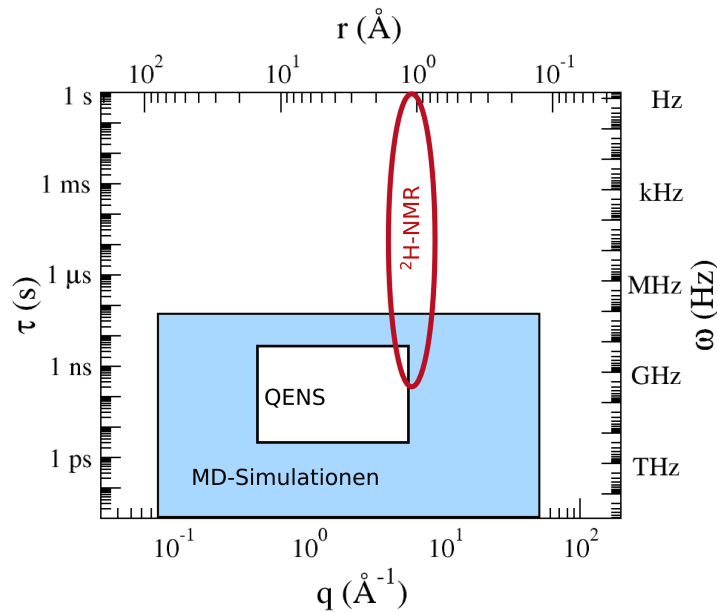


Abb. 3.14: Vergleich der mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden zugänglichen Zeit- und Längenskalen.

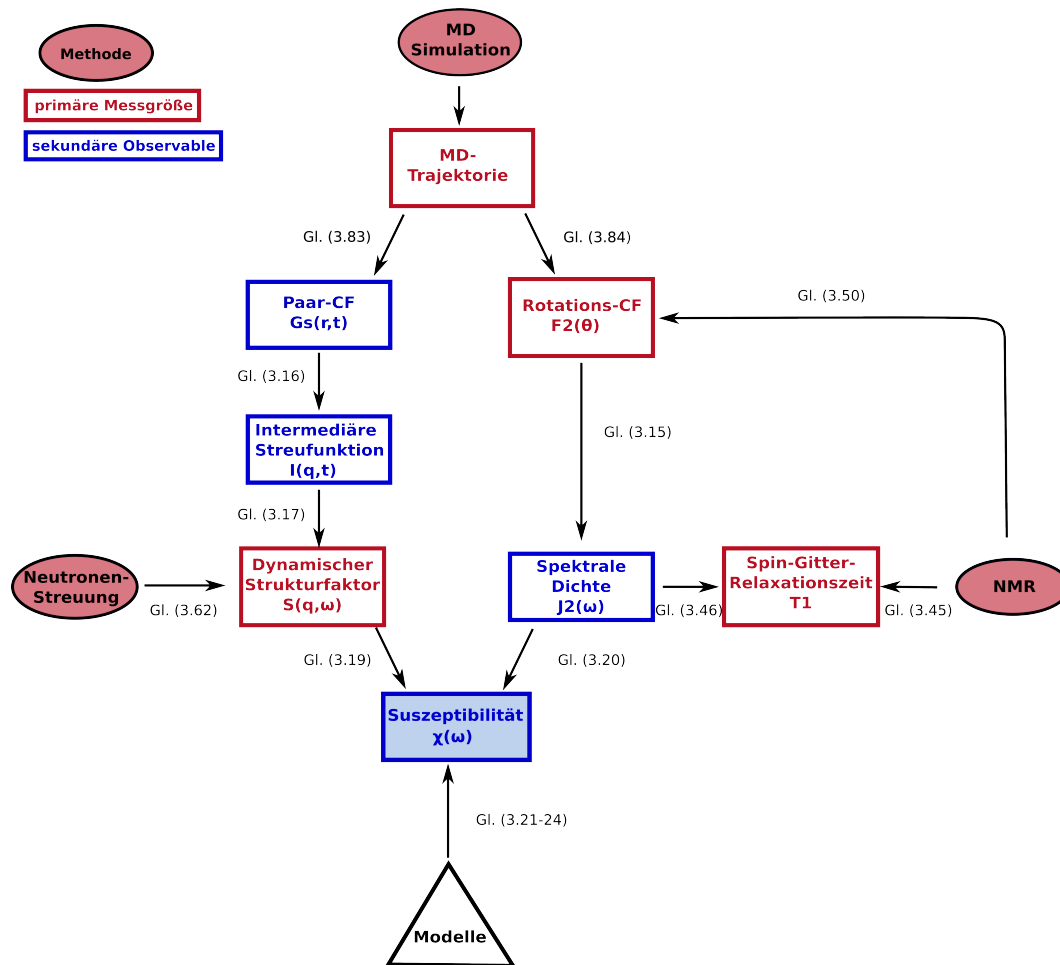


Abb. 3.15: Überblick über die Observablen der verschiedenen Methoden und ihre Relationen zueinander.

Während mit ^2H -NMR-Spektroskopie Rotationsbewegungen von Bindungen gemessen werden, liefert die Neutronenstreuung Informationen über Rotations- und Translationsbewegung. MD-Simulationen ermöglichen die Berechnung von sowohl der spektralen Dichte, als auch des dynamischen Strukturfaktors aus der simulierten Trajektorie und ermöglichen es so, die Brücke zwischen beiden experimentellen Methoden zu schlagen.

4 Materialien und Probencharakterisierung

In diesem Kapitel werden die untersuchten Materialien vorgestellt. Dazu wird einerseits eine kurze Vorstellung der Funktion der untersuchten Proteine in Kap. 4.1 gegeben und andererseits die Probenpräparation in den Kapiteln 4.2 und 4.3 beschrieben.

Im Verlauf der Arbeit erweist es sich als wichtig, den Anteil der Protonen oder Deuteronen in Methylgruppen, in austauschbaren Positionen oder nahe des Rückgrats zu kennen, da diese verschiedenen Positionen sowohl in der NMR-Spektroskopie als auch in der Neutronenstreuung dynamisch unterscheidbar sind. In diesem Kapitel wird daher die Abschätzung für das jeweilige Protein vorgestellt.

4.1 Proteine

In der vorliegenden Arbeit werden Proteine mit unterschiedlichem strukturellen Komplexitätsgrad untersucht. Dabei handelt es sich um Elastin, Myoglobin und Cyano-Phycocyanin (CPC). Für jedes der Proteine wird im Folgenden ein kurzer Überblick über die wesentlichen Eigenschaften gegeben.

Alle Proteine liegen als gefriergetrocknete Proteine und z.T. in deuteriertem Zustand vor. Im zweiten Abschnitt dieses Kapitels wird deshalb der Einfluss dieser Probeneigenschaften besprochen.

4.1.1 Verwendete Proteine

Elastin

Elastin (ELA) ist ein Protein ohne definierte Primär- und Sekundärstruktur [53, 151, 263]¹. In Wirbeltieren ist es für die Elastizität des Gewebes verantwortlich. Die Elastizität des Proteins wird nach dem Modell von Urry et al. [264] auf die häufig wiederholte Sequenz VPGVG² und deren Wechselspiel mit dem Hydratationswasser zurückgeführt. Zur experimentellen Untersuchung wurde bovines Elastin (Sigma-Aldrich) verwendet, in den MD-Simulationen die Sequenz (VPGVG)₅₀.

¹ Die genaue Sequenz von Elastin ist nicht definiert, da Elastin *in vivo* durch alternatives Spleißen nach verschiedenen „Bauplänen“ hergestellt wird [151, 237]. Elastin ist also immer ein Gemisch von Proteinen mit unterschiedlicher Sequenz.

² Die Bezeichnung folgt dem Einbuchstabencode für Aminosäuren: V= Valin, P= Prolin, G= Glycin.

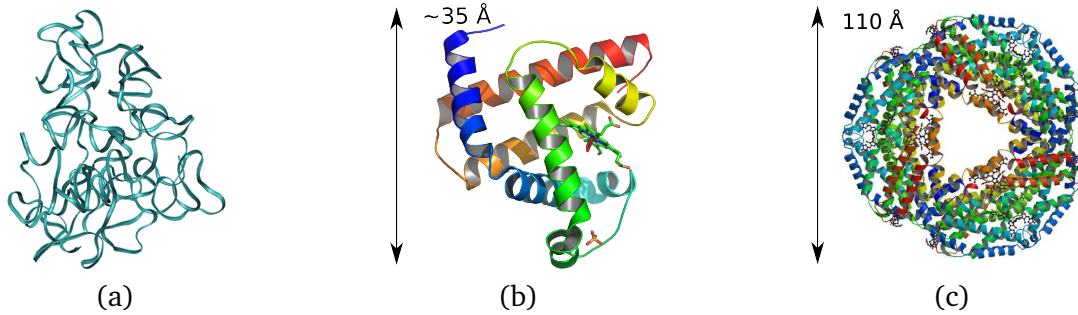


Abb. 4.1: Strukturen der verwendeten Proteine. In a) ist beispielhaft das Modellelastin (VPGVG)₅₀ aus MD-Simulationen gezeigt. Es besitzt weder definierte Primär- noch Sekundärstruktur. In b) ist Myoglobin gezeigt (Größenangabe gemäß [134], Bildquelle: PDB 1BZR). Es ist klein, globulär und enthält vor allem α -Helices. In c) ist das hexamere CPC gezeigt (Größenangabe gemäß [76], Bildquelle: PDB 1JBO).

Samouillan et al. untersuchten die Glasübergangstemperatur von Elastin-Wasser-Mischungen mit dynamische Differenz-Kalorimetrie (engl. Differential scanning calorimetry (DSC)) und stellten fest, dass T_g stark vom Wassergehalt abhängt und für $h < 0.3$ g/g oberhalb von Raumtemperatur liegt (vgl. Abb. 4.2) [229]. Damit unter-

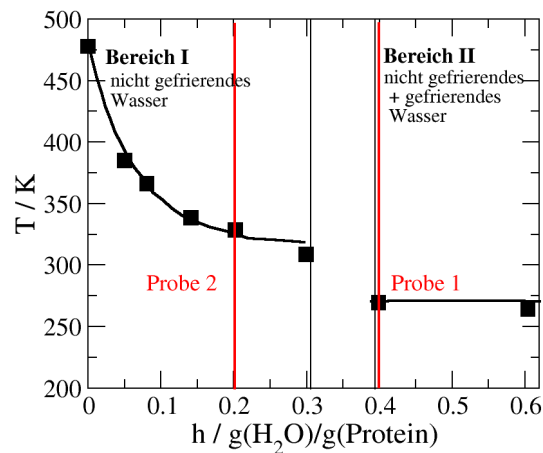


Abb. 4.2: Glasübergangstemperatur von Elastin-Wasser-Gemischen gemessen mit DSC als Funktion des Hydratationsgrades. Die Daten wurden der Referenz [229] entnommen und der Wassergehalt in den Hydratationsgrad umgerechnet. Als senkrechte Linien sind die Hydratationsgrade der verwendeten Elastin-Proben mit $h = 0.4$ g/g und $h = 0.2$ g/g eingezeichnet.

scheidet sich Elastin von anderen Proteinen, für die eine solche Glasübergangstemperatur bei $T = 200 - 240$ K gefunden wurde [123, 230]. Diese Eigenschaft, dass Elastin bei niedrigem Hydratationsgrad immobil ist, wird in Kapitel 7 ausgenutzt.

Myoglobin

Myoglobin (MYO) ist ein kleines globuläres Protein mit einer Länge von 153 Aminosäuren, dessen Aminosäurekette sich hauptsächlich in das Sekundärstrukturelement der α -Helices faltet (s. Abb. 4.1(b)). Myoglobin ist an der Sauerstoffversorgung von Wirbeltieren beteiligt [262].

In dieser Arbeit wurde Myoglobin mit MD-Simulationen untersucht. Die Startstruktur in den MD-Simulationen entspricht dem Proteindatenbank(PDB)-Eintrag mit dem Kürzel 1BZR, das aus Röntgenstrukturaufklärung von Kachalova entstand [128]. Die meisten Simulationen des Myoglobins, die in dieser Arbeit diskutiert werden, wurden in der Masterarbeit von Felix Klameth durchgeführt [139], die Auswertung erfolgte teilweise im Rahmen dieser Arbeit.

Cyano-Phycocyanin

Das strukturell komplexeste der untersuchten Proteine ist das Cyano-Phycocyanin (CPC). Es ist ein Lichtsammelprotein der Klasse der Phycobiliproteine aus dem Photosyntheseapparat von Blaualgen, welches mit Hilfe der chromophoren Phycocyanobilin-Gruppe Licht im Wellenlängenbereich $\lambda = 550 - 650$ nm absorbiert. Diese Eigenschaft spiegelt sich in der tiefblauen Farbe des Proteins wider.

CPC ist sehr temperaturstabil bis 70 °C [3]. Es besteht aus drei α - β Heterodimeren (s. Abb. 4.1(c)) und ist das größte der untersuchten Proteine. Das uns von Prof. Doster (TU München) zur Verfügung gestellte CPC ist vollständig deuteriert. Es wurde in einem aufwändigen Herstellungsprozess gewonnen, der in [48] beschrieben ist.

4.1.2 Bemerkungen zu den durchgeführten Messungen an Proteinen

Proteine liegen in einer Zelle in ihrer protonierten Form und in ihrer gelösten Struktur vor. In den Experimenten hingegen werden sie als lyophilisierte (= gefriergetrocknete), hydratisierte Pulver untersucht. Darüber hinaus wird die Dynamik von vollständig deuterierten Proteinen mit der Dynamik von hydrierten Proteinen verglichen. An dieser Stelle soll deshalb der Einfluss dieser Unterschiede diskutiert werden.

Alle Proteine wurden als lyophilisierte Pulver mit niedrigen Hydratationsgraden verwendet. Dies hat den Vorteil, dass Wasser die Proteindynamik ermöglichen kann, die Gesamtrotation und -translation jedoch unterdrückt ist.

Beim Umgang mit lyophilisierten Proteinen ist zu beachten, dass die Proteine während der Lyophilisierung denaturieren können und infolgedessen β -Faltblatt-dominierte Aggregate bilden [103, 228]. Diese Aggregation ist reversibel, wenn das Protein wieder gelöst wird. In MD-Simulationen der Proteine wird von der Struktur des Proteins in Lösung ausgegangen. Strukturänderungen wie Denaturierungen oder Umfaltungen treten im simulierten Zeitraum nicht auf. Da in dieser Arbeit der Fokus auf internen Bewegungen des Proteins liegt, die, wie sich herausstellen wird, unabhängig vom Se-

kundärstrukturgehalt der untersuchten Proteine sind, sind mögliche Strukturänderungen für das Ergebnis nicht ausschlaggebend.

Denaturierung kann in Proteinen auch bei hohen Temperaturen auftreten. Um diese zu vermeiden, wurde der Messbereich auf Temperaturen $T \leq 310\text{ K}$ beschränkt.

Einen weiteren experimentellen Aspekt stellt die Protonierung/Deuterierung der Proben dar. Protonen und Deuteronen lassen sich mit NMR-Spektroskopie und Neutronenstreuung sehr gut unterscheiden. Eine selektive Protonierung/Deuterierung ermöglicht es, gezielt nur einen Teil des Probenmaterials (Wasser oder Protein) zu untersuchen. Dabei ist zu beachten, dass ein Deuteron mit einer Masse von $m = 2.013\text{ u}$ doppelt so schwer wie ein Proton mit $m = 1.007\text{ u}$ ist. Infolge einer stärkeren Wasserstoffbrückenbindung zwischen den D_2O -Molekülen, weist deuteriertes Wasser im Vergleich zu hydriertem Wasser eine bis zu 1.4-fach höhere Viskosität auf [104,207]. Die beobachteten dynamischen Prozesse können demzufolge in deuteriertem Wasser verlangsamt sein. Im Rahmen der Genauigkeit der verwendeten Experimente konnte der für die Proteindynamik resultierende Unterschied nicht aufgelöst werden (vgl. z.B. Abb. 7.1). Der Isotopen-Effekt wird deshalb im Folgenden nicht weiter betrachtet.

Sowohl bei der Verwendung von lyophilisierten Proben als auch von Kontrastvariation durch Verwendung von Deuteronen handelt es sich um Standardverfahren, so dass die Ergebnisse mit ähnlichen Untersuchungen in der Literatur verglichen werden können.

4.2 Präparation und Charakterisierung der Cyano-Phycocyanin-Proben

Das vollständig deuterierte Protein CPC wird mit ^2H -NMR-Spektroskopie untersucht. Die Ergebnisse werden in Kapitel 6 vorgestellt. In diesem Abschnitt wird die Probenpräparation erläutert.

Die trockene Probe und die Probe mit $h = 0.3\text{ g/g}$ wurde in der Masterarbeit von Beke Kremmling [147] temperaturabhängig charakterisiert. Ergänzend zu diesen vorhandenen Daten wird hier die temperaturabhängige Charakterisierung insbesondere der höher hydratisierten Proben vervollständigt.

4.2.1 Handhabung der Probenpräparation

Zur Untersuchung der internen Proteindynamik in Abhängigkeit vom Wassergehalt wurden NMR-Proben mit 4 verschiedenen Hydratationsgraden hergestellt: mit $h = 0.0, 0.3, 0.5$ und 1.0 g/g .

Zunächst wurden die austauschbaren Deuteronen³ des vollständig deuterierten Proteins durch mehrfaches Waschen des Proteins mit H₂O entfernt. Dadurch wird sichergestellt, dass das gesamte Signal auf Proteindeuteronen zurückzuführen ist und nicht ein Teil des Signals durch Deuteronen verursacht wird, die sich im Hydratationswasser der Probe befinden.

Der Hydratationsgrad wurde durch Vermischen von Wasser mit der entsprechenden Menge des Proteins eingestellt. Die dabei entstehende Probe ist je nach Hydratationsgrad trocken-krümelig bis gelartig-breiig.

Die Proben wurden in ein NMR-Röhrchen gefüllt, mit Teflonband abgedeckt und die Glasröhrchen auf die durch den verwendeten Probenkopf und die Bohrung des Magneten vorgegebene Länge abgeschmolzen. Dabei wurde der probengefüllte Teil des Röhrchen in einem stickstoffgekühlten Block vor der Hitze der Flamme geschützt, um ein Denaturieren oder gar Verbrennen des Proteins zu verhindern. Das Abschmelzen der Proben wurde von Herrn Frank Fischer übernommen.

4.2.2 Anteil der Protonen in dynamisch unterscheidbaren Untergruppen

In den Proteinproben gibt es drei dynamisch unterscheidbare Protonengruppen. Dies sind (1) die Protonen des Wassers, (2) die Protonen der Methylgruppe des Proteins und (3) die übrigen Protonen im Protein. Die Protonen des Proteins sind wie oben beschrieben durch Deuteronen ersetzt und tragen zum ²H-NMR-Signal bei.

Das Wasser wird in den Messungen nicht detektiert.

Das relative Verhältnis von Methyldeuteronen zu den übrigen Deuteronen lässt sich aus der Aminosäuresequenz des CPC [50] abschätzen. Es ergibt sich ein Anteil von 30% für die Methylgruppendeuteronen und 70% für die Nicht-Methyldeuteronen. Unter der Annahme, dass alle austauschbaren Protonen ausgetauscht haben, ändert sich das Verhältnis vom Methyl-:Nichtmethyl-Deuteronen auf 43:57.

Die Nichtmethylprotonen haben überwiegend ihren Sitz nahe des Proteinrückgrat (vgl. Abb. 2.4(a)). Der Anteil der Protonen, die ≤ 2 Bindungen vom Proteinrückgrat entfernt sind, beträgt 64%. Deshalb wird im Folgenden dieser Anteil als charakteristisch für die Rückgratbewegung angenommen und vereinfachend als Rückgratprotonen bezeichnet.

³ Dazu zählen alle Deuteronen, die an Stickstoff oder Sauerstoff gebunden sind. Den Hauptbeitrag machen folglich die Aminoprotonen in der Peptidbindung aus, darüber hinaus befinden sich in den Seitenketten der Aminosäuren W, S, N, Q, Y, K, R und H austauschbare Protonen.

4.3 Präparation und Charakterisierung der Elastin-Proben

Elastin wurde experimentell mit quasielastischer Neutronenstreuung untersucht. Mit dem Rückstreuспекrometer SPHERES (s. Kap. 3.3.2) wurden Messungen an zwei unterschiedlich präparierten Sets von Elastinproben durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Kapitel 7 beschrieben.

Untersucht wurde Elastin mit Hydratationsgraden von $h = 0.2 \text{ g/g}$ und $h = 0.4 \text{ g/g}$. Jedes Set bestand aus einer Probe mit hydriertem Wasser und einer Probe mit deuteriertem Wasser.

Die Messdaten an den Proben mit einem Hydratationsgrad von $h = 0.4 \text{ g/g}$ wiesen in der Neutronenstreuung die Signatur des Schmelzens von Wasser bei ca. 273 K auf (vgl. Abb. 7.1), was die Auswertung der Daten erheblich beeinträchtigte. Daraufhin wurden die Proben vor der zweiten Messzeit als Funktion des Hydratationsgrades charakterisiert. Zur Charakterisierung wurde dynamische Differenz-Kalorimetrie eingesetzt.

4.3.1 Nachweis von Eis mit dynamischer Differenz-Kalorimetrie

Eisbildung in biologischen Proben ist in mehrfacher Hinsicht problematisch. Durch Ausbilden von Eiskristallen können die Proteine mechanisch zerstört werden. Weiterhin kann selektives Ausfrieren von salzfreiem Wasser den pH-Wert des verbleibenden, flüssigen Wassers so verändern, dass das Protein seine Struktur ändert oder gar denaturiert [230]. Daher müssen die untersuchten Proben eisfrei sein. Das Vorliegen von Eis in Elastinproben wurde mit dynamischer Differenz-Kalorimetrie untersucht.

Die DSC ist eine Methode, um Änderungen der Wärmekapazität in einer Probe als Funktion der Temperatur zu vermessen. Beim Kristallisieren von Wasser wird Wärme frei. Dies zeigt sich in der DSC als exothermer Peak. Beim Schmelzen von Wasser wird ein endothermer Peak gemessen. Eine Einführung in die DSC findet sich z.B. in [115].

Mittels DSC wurde der Hydratationsgrad ermittelt, oberhalb dem in Elastin kristallines Wasser vorliegt. Dazu wurden Elastinproben bei verschiedenem Hydratationsgrad vermessen. Abbildung 4.3(a) zeigt die endothermen Peaks des Aufheizens bei einer Heizrate von 10 K/min und 40 K/min. Die freiwerdende Enthalpie ΔH wird als Integral unter dem Peak bestimmt und nimmt als Funktion des Hydratationsgrades ab (s. Abb. 4.3(b)). Eine Extrapolation der Werte führt zu einem Grenzwert von $h = 0.3 \text{ g/g}$ als maximalem Hydratationsgrad ohne Eisbildung.

Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit DSC-Studien an Elastin [129, 229] und anderen Proteinen [14, 65, 89, 154, 205].

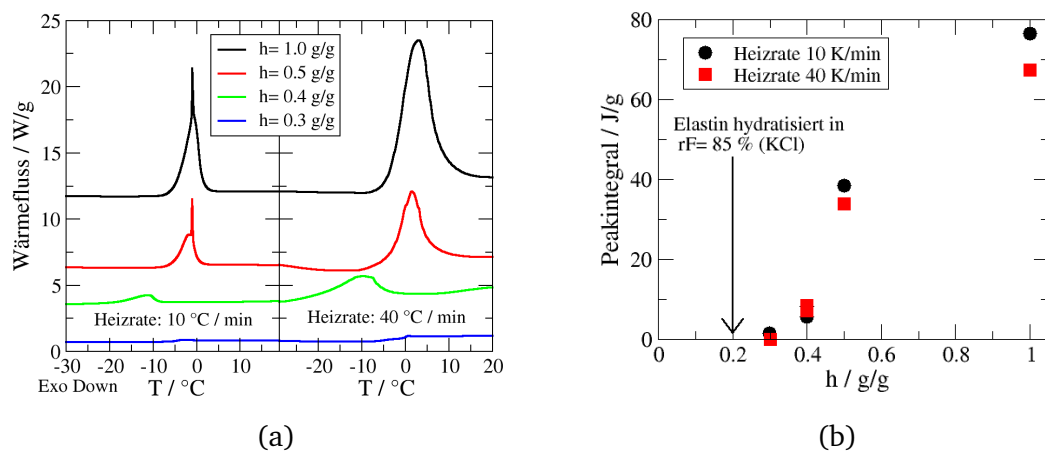


Abb. 4.3: (a) Wärmekapazität beim Abkühlen der Elastinproben bei unterschiedlichen Hydratationsgraden für Heizraten von 10 K/min und 40 K/min. Die Höhe des Peaks nimmt mit steigendem Hydratationsgrad zu. (b) Integral über die Höhe des Schmelzpeaks. Extrapoliert ergibt sich ein Einsetzen der Kristallisation an Elastin ab einem Hydratationsgrad von 0.3 g/g.

4.3.2 Hydratation in Atmosphäre mit definierter Feuchtigkeit

Um Proben ohne gefrierendes Wasser herzustellen, wurden die Proben in einer Atmosphäre mit definierter Feuchtigkeit hydratisiert.

Das Elastin wurde dazu zunächst über Silicagel getrocknet, und anschließend für mehrere Tage in einer abgeschlossenen Kammer einer Wasseratmosphäre (relative Luftfeuchte: 100 % r.F.) ausgesetzt. Die Massenzunahme als Funktion der Zeit ist in Abbildung 4.4 gezeigt.

Nach 50 h wird in Elastin ein Hydratationsgrad von 0.3 g/g erreicht. Um die bei diesem Hydratationsgrad mögliche Kristallisation des Hydratwassers zu verhindern, wurde für die zweite Messreihe am FRMII (Forschungsreaktor München II) ein Hydratationsgrad von 0.25 g/g angestrebt. Dieser konnte unter Verwendung einer gesättigten KCl-Lösung (relative Luftfeuchte: $rF = 85\%$ [102]) in Testpräparationen erreicht werden.

Deuteriertes Wasser führte durchweg zu einer niedrigeren Luftfeuchtigkeit und zu einer geringeren Massenzunahme des Elastins. Deshalb wurde für die Probenpräparation statt einer Salzlösung reines D₂O verwendet. Die mit dem Feuchtigkeitsmessgerät (Gerätebezeichnung: testo 174H) gemessenen Luftfeuchtwerte für eine Atmosphäre über gesättigter KCl-H₂O-Lösung und über reinem D₂O sind in Abb. 4.4(b) gezeigt.

Für eine große Probenmenge konnte sowohl mit H₂O als auch mit D₂O lediglich ein Hydratationsgrad von 0.2 g/g erreicht werden. Dies war im Nachhinein auf die unzureichende Befeuchtung unterer Probenschichten zurückzuführen und kann in Zukunft

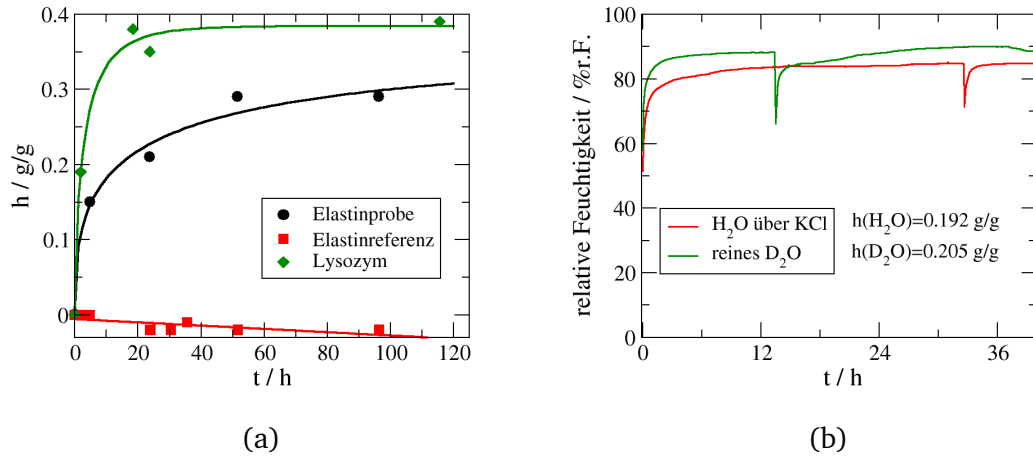


Abb. 4.4: a) Hydratation von Elastin und Lysozym unter reiner Wasseratmosphäre. b) Relative Luftfeuchtigkeit der Probenkammer mit reinem D_2O und mit einer mit KCl gesättigten H_2O -Lösung. Die Dips entstehen, wenn die Probenkammer kurz geöffnet wird, z.B. um die Probe in die Kammer zu legen.

durch mehrfaches Durchmischen der Proben während der Präparation überwunden werden.

4.3.3 Handhabung der Probenpräparation

Für die Neutronenstreuexperimente werden rechteckige Probenbehälter (Küvetten) aus Aluminium⁴ mit einem Probenvolumen von $a \cdot b \cdot d = 4.25 \text{ cm} \cdot 3.75 \text{ cm} \cdot d$ mit einstellbarer Dicke d eingefüllt. Um den Anteil an Mehrfachstreuung zu minimieren und den Anteil an Einfachstreuung zu maximieren, wird die Probenmenge so berechnet, dass die Transmission T durch die Probe 90% beträgt.

Für die Zelldicke d gilt dann

$$d = \frac{0.1}{n} \sigma \quad (4.1)$$

mit der molekularen Anzahldichte $n = \frac{N_A}{m} \rho_V$ und dem Gesamtstreuquerschnitt σ .

Die Abschätzung der exakten Probenmenge für das Protein kann nur näherungsweise erfolgen, weil die Dichte des Protein-Wasser-Pulvers und der Gesamtstreuquerschnitt des Elastins unbekannt sind.

⁴ Aluminium wird als Küvettenmaterial verwendet, da es sich durch einen geringen Streuquerschnitt auszeichnet und folglich "transparent" für Neutronen ist.

Deshalb wird eine Abschätzung für reines Wasser vorgenommen: Mit dem Streuquerschnitt des Wassers $\sigma_{H_2O} = 165 \cdot 10^{-24} \text{ cm}^2$, der Dichte $\rho_V = 1 \text{ g/cm}^3$ und dem Molekulargewicht $M = 18 \text{ g/mol}$ ergibt sie sich zu

$$d = 0.018 \text{ cm.} \quad (4.2)$$

Mit dieser Zelldicke ergibt sich das Volumen der Küvette zu $V = 0.29 \text{ cm}^3$ und die Wassermasse zu $m_W = V \cdot \rho = 0.29 \text{ g}$ Wasser. Für die Messung mit D_2O wurde eine Zelldicke von $d = 0.02 \text{ cm}$ eingesetzt.

Die eingesetzten Probenmassen m_{Probe} sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Das befeuchtete Protein wurde möglichst gleichmäßig in der Küvette verteilt, die Küvette mit Indium abgedichtet und verschlossen. Dabei wurde auf eine schnelle Ausführung geachtet, um den Wasserverlust der Proben bei Kontakt mit der Umgebungsluft so gering wie möglich zu halten.

4.3.4 Anteil der Protonen in dynamisch unterscheidbaren Untergruppen

In den derart präparierten Proben gibt es, wie bereits für das CPC eingeführt, verschiedene dynamisch unterscheidbare Protonengruppen. Dies sind (1) die Protonen des Wassers, (2) die Protonen der Methylgruppe des Proteins und (3) die übrigen Protonen im Protein. In die Gruppe der übrigen Protonen fallen die austauschbaren Protonen (4), deren Anteil ebenfalls von Interesse ist.

Tab. 4.1.: Eingesetzte Probenmassen und relative Anteile der Protonen in den dynamisch unterscheidbaren Gruppen

Probe	$m_{\text{Probe}} / \text{mg}$	Wasser	Methyl	Protein	austauschbar
ELA_H ₂ O, $h = 0.2 \text{ g/g}$	463	0.23	0.25	0.52	0.00
ELA_D ₂ O, $h = 0.2 \text{ g/g}$	505	0.00	0.32	0.68	0.10
ELA_H ₂ O, $h = 0.4 \text{ g/g}$	398	0.37	0.20	0.43	0.00
ELA_D ₂ O, $h = 0.4 \text{ g/g}$	515	0.00	0.32	0.68	0.10

Die Bestimmung der relativen Anteile der Protonen in jeder dieser Gruppen ist nicht eindeutig möglich, da das Elastin keine definierte Sequenz hat. Dennoch wurde eine Abschätzung ausgehend von der Aminosäuresequenz von Elastin nach Schmelzer [237] durchgeführt⁵. Sie ergibt die in Tabelle 4.1 angegebenen Protonenanteile.

⁵ Die Zahl der austauschbaren Protonen wurde mit 1 pro Aminosäure (mit Ausnahme von Prolin, das kein austauschbares Proton besitzt) abgeschätzt. Dies ist eine Maximalabschätzung, der Austausch ist in dieser Höhe nicht quantitativ zu erwarten, da (1) Elastin ein hydrophobes Protein ist und folglich ein Großteil seiner Amidprotonen keinen Zugang zum Wasser hat [162] und (2) die für den Austausch notwendige Dynamik [68] in einem lyophilisierten Protein verglichen mit einem Protein in Lösung schwach ist [247].

Für die niedrig hydratisierte Probe können bis maximal 43 % der Wasserprotonen (bei $h = 0.2 \text{ g/g}$) ausgetauscht werden. Dieser hohe Wert zeigt, dass es einen Streubeitrag des Wassers auch in der deuterierten Probe geben kann, der in der Datenauswertung berücksichtigt werden muss. Ein Austausch der Amidprotonen durch Deuteronen kann diesen Anteil in zukünftigen Messungen reduzieren.

5 Untersuchung der Protein- und Wasserdynamik mit MD-Simulationen

In diesem Kapitel wird die Proteindynamik in zwei verschiedenen Proteinen, Myoglobin und Elastin, mit MD-Simulationen charakterisiert.

Drei Fragestellungen stehen im Zentrum des Kapitels: (1) Welche der verschiedenen Theorien zur Beschreibung des anomalen Korrelationsabfalls ist in Übereinstimmung mit den Simulationen? (2) Welche mikroskopischen Bewegungsprozesse verursachen den Korrelationsabfall im Protein? (3) Wie spielen Protein und Wasser zusammen?

MD-Simulation bieten hierfür den Vorteil, dass die Trajektorie jedes einzelnen Atoms zugänglich ist. Dies wird ausgenutzt, indem beispielsweise das Verhalten von Subensembles von Proteinatomen oder Wasseratomen in Abhängigkeit ihres Abstandes zur Protein-Wasser-Grenzfläche ausgewertet werden. Weiterhin werden künstliche Systeme konstruiert, wie die Simulation eines Proteins mit der Temperatur $T = 300\text{ K}$ umgeben von Wasser bei einer anderen Temperatur.

Das Kapitel gliedert sich wie folgt: In Kap. 5.1 wird die Proteindynamik untersucht. Dafür werden zum einen verschiedene Ansätze zur Beschreibung des anomalen Korrelationsabfalls in Proteinen getestet und zum anderen mikroskopische Informationen aus MD-Simulationen vorgestellt. Daran anschließend wird kurz die Dynamik des Hydratationswassers im Vergleich zu Bulkwasser vorgestellt (Kap. 5.2) und in Kapitel (Kap. 5.3) wird das Zusammenspiel von Wasser und Proteindynamik untersucht. Abschließend werden die gewonnen Einblicke diskutiert (Kap. 5.4).

Die in den Simulationen verwendeten Proteine sind in Kap. 4 vorgestellt, die Grundlagen der MD-Simulation wurden in Kap. 3.4 erläutert. Die Simulationen von Myoglobin, sowie die Auswertung der Proteindynamik mit dem fraktionalen Ornstein-Uhlenbeck-Prozess wurden von Felix Klameth durchgeführt.

5.1 Charakterisierung der Proteindynamik mit MD-Simulationen

In diesem Abschnitt wird die Proteindynamik von Elastin und Myoglobin hydratisiert mit einem Hydratationsgrad von $h = 0.3\text{ g/g}$ vorgestellt. Die Daten stammen aus Simulationen von einem Elastinmolekül (1ELA) oder 8 Elastinmolekülen (8ELA) in einer Simulationsbox. In den Myoglobinsimulationen (MYO) besteht das System aus 4

Myoglobinmolekülen. Einige der Daten stammen aus Simulationen mit dem Kraftfeld OPLS, das sämtliche Atome separat simuliert (all-atom Kraftfeld). Dadurch können verschiedene Protonengruppen unterschieden werden. Dieses System enthält ebenfalls 8 Elastinmoleküle und wird mit (8ELA-AA) bezeichnet.

Die Untersuchung der Proteindynamik gliedert sich in zwei Teile. Im Abschnitt 5.1.1 wird der anomale Abfall von Korrelationsfunktionen mit verschiedenen Ansätzen untersucht, im zweiten Teil 5.1.2 werden verschiedene Größen zur mikroskopischen Charakterisierung der Proteindynamik ausgewertet.

5.1.1 Anomaler Abfall von Korrelationsfunktionen

Proteine zeigen Dynamik über viele Größenordnungen in der Zeit [255]. Dies geht einher mit einem subdiffusiven mittleren Verschiebungsquadrat und mit Korrelationsfunktionen, deren Abfall sich, wie in Kapitel 2.2 eingeführt, über mehrere Größenordnungen in der Zeit mit einem Potenzgesetz oder einem logarithmischen Gesetz beschreiben lässt. Diese anomale Dynamik äußert sich insbesondere im mittlere Verschiebungsquadrat, der intermediären Streufunktion und in Orientierungskorrelationsfunktionen. Alle drei Größen sind für die beiden untersuchten Proteine in den Abbildungen 5.1 und 5.7 zu dargestellt.

Abbildung 5.1 zeigt die Orientierungsautokorrelationsfunktion (OCF) F_2 der Carbonylgruppen für (a) Elastin und (b) Myoglobin im Temperaturbereich 170-310 K, in Abbildung 5.7 sind das mittlere Verschiebungsquadrat (MSD) $\langle r^2 \rangle$ (vgl. Gl. (3.84)) sowie die inkohärente intermediäre Streufunktion (ISF) $(S(q, t))$ (vgl. Gl. (3.82)) für Amidstickstoffatome der Elastinsimulation 8ELA gezeigt. Beide Atomgruppen, die Carbonylgruppe und die Amidstickstoffatome, sitzen im Proteinerückgrat und geben dessen Bewegung wieder.

Der Abfall der Korrelationsfunktionen F_2 und $S(q, t)$ ist im betrachteten Zeitfenster (1 ps-2 ns) wenig ausgeprägt und sehr gestreckt. Dies deutet bereits darauf hin, dass sich die Kurven nicht mit einer Exponentialfunktion beschreiben lassen. Ein Fit mit der KWW-Gleichung (2.10) wurde versuchsweise durchgeführt und ist in Abbildung 5.1(a) als gepunktete Linie für die Temperatur 310 K gezeigt. Der Streckungsparameter hat den Wert von $\beta = 0.11$, ist also sehr klein. Der KWW-Abfall kann den anomalen Abfall im intermediären Zeitbereich dennoch nicht abbilden. Auch das MSD zeigt das charakteristische anomale Verhalten, einen subdiffusiven Anstieg $\langle r^2 \rangle \propto t^\alpha$ im genannten Zeitintervall (vgl. 5.7(a)).

Ein anomaler Abfall der intermediären inkohärenten Streufunktion ist nicht allein charakteristisch für Proteine, sondern wurde auch für andere Systeme gefunden. In der Masterarbeit von Alexander Janz [124] zeigte sich diese Charakteristik in den Korrelationsfunktionen des Pentapeptids VPGVG (s. Abb. 5.2(a), $h = 0.42$ g/g). Kai Stroh untersuchte in seiner Bachelorarbeit [251] die Dynamik von polymeren Molekülen, die

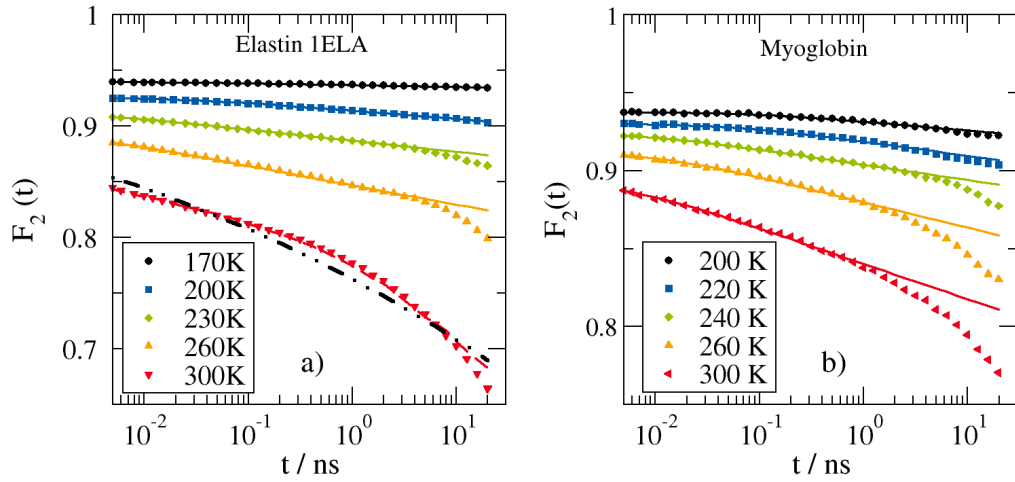


Abb. 5.1: Orientierungsautokorrelationsfunktion der Carbonylgruppen von a) Elastin und b) Myoglobin bei verschiedenen Temperaturen. Die durchgezogenen Linien sind Fits mit Gleichung (5.1). Ein KWW-Fit nach Gleichung (2.10) ist als gestrichelte Linie in a) eingezeichnet.

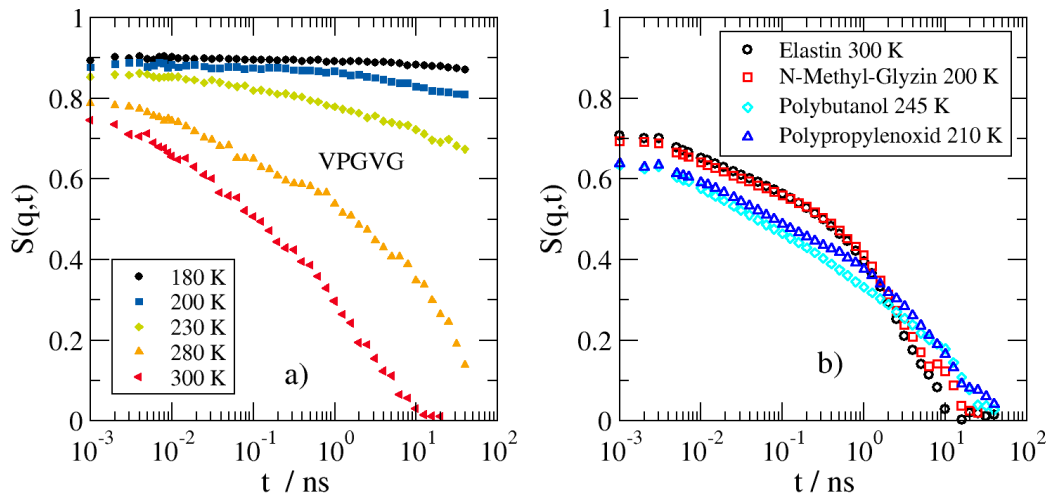


Abb. 5.2: Intermediäre Streufunktion der Stickstoffatome oder äquivalenter Positionen in a) für das elastinähnliche Peptid VPGVG bei verschiedenen Temperaturen (Daten aus [124]) und in b) für verschiedene polymere Moleküle mit einer Struktur zwischen Protein und Polymer: Elastin, N-Methylglyzin, Polybutanol, Polypropylenoxid (Daten aus [251]). Die Temperaturen sind so gewählt, dass der hintere Abfall für alle Systeme etwa aufeinander liegt.

einen chemischen Aufbau zwischen Proteinen und Polymeren haben¹. Alle simulierten Moleküle, vom Protein bis hin zum Polymer zeigen den anomalen Abfall bei intermediären Zeiten, wenn auch in unterschiedlichen Temperaturbereichen (s. Abb. 5.2(b)). Die gezeigten Temperaturen sind so gewählt, dass die Abfälle aller Systeme etwa aufeinander liegen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass weder die Länge eines Proteins, noch spezifische Eigenschaften, wie die Planarität der Peptidbindung oder die Fähigkeit Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden zu können, ausschlaggebend für die Ausbildung eines anomalen Abfalls sind. Dies zeigt sich auch darin, dass dieses Phänomen auch für Glasbildner [33, 97], Kolloide [248] und Polymermischungen [189] diskutiert wird.

In der Literatur wurden eine Vielzahl von theoretischen Ansätzen herangezogen, um den anomalen Abfall zu erklären. Hier werden drei Modelle zur Beschreibung der Proteindynamik herangezogen. Diese drei Ansätze wurden in Kapitel 2.2 einführend vorgestellt:

1. Der Energielandschaftsansatz.
2. Die Modenkopplungstheorie höherer Ordnung
3. Der fraktionale Ornstein-Uhlenbeck Prozess

Die Auswertungen zu jedem Ansatz werden in einem eigenen Abschnitt vorgestellt. Begonnen wird mit dem Energielandschaftsansatz. Die Ergebnisse dieses Kapitels sind Teil der Veröffentlichung [130].

Energielandschaftsansatz

Zunächst wird der in Kapitel 2.2.1 vorgestellte Ansatz zur Interpretation der anomalen Dynamik im Rahmen des Energielandschaftsmodells herangezogen. Die Korrelationsfunktionen F_2 und $S(q, t)$ werden mit der phänomenologischen Gleichung (2.16) gefittet

$$\phi(t) = [1 + k(T)t]^{-n}. \quad (5.1)$$

Die Fits der OCF sind als durchgezogene Linien in Abbildung 5.1 dargestellt und geben den Verlauf der OCF im intermediären Zeitbereich gut wieder. Bei langen Zeiten weichen die MD-Daten jedoch ab. Hier wird der Potenzgesetzabfall von einem anderen Relaxationsprozess abgelöst, dessen Ursache später in diesem Kapitel diskutiert wird (s. Kap. 5.1.2).

¹ In der Bachelor-Arbeit von Kai Stroh wurde das Elastinmodell (VPGVG)₅₀ schrittweise zu Polypropylenoxid umgebaut. Im ersten Schritt wurden dafür alle Seitenketten im Molekül entfernt und ein Polyglyzin-Molekül erstellt. Anschließend wurde dem Polymer die Fähigkeit intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, genommen, indem eine Methylgruppe an das Amidstickstoffatom angebracht wurde. Das entstehende Molekül ist das N-Methylglyzin. In einem weiteren Schritt wurde die Planarität der Peptidbindung aufgehoben und das Stickstoffatom durch ein Kohlenstoffatom ersetzt (Polybutanol). Schließlich wurde Polypropylenoxid erstellt und simuliert.

Gleichung (5.1) resultiert aus einer Energiebarrierenverteilung mit einem exponentiellen Schwanz [9]

$$g(E_A) = \begin{cases} \frac{(\tau/\tau_0)^n}{RT\Gamma(n)} \exp(-nE_A/RT) & E_A < E_A^{max} \\ 0 & E_A > E_A^{max} \end{cases} \quad (5.2)$$

Die Energiebarrierenverteilung ist im Modell von Austin und Frauenfelder temperaturunabhängig. Demnach muss nach Gleichung (2.19), eine lineare Temperaturabhängigkeit des Exponenten n gelten und die Peak-Rate $k^{Peak} = nk(T)$ muss einem Arrhenius-Gesetz (s. Gl. (2.9)) genügen [9], (vgl. Kap. 2.2.1). Diese beiden Vorhersagen werden durch die Auftragung der Fitparameter in Abbildung 5.3 überprüft.

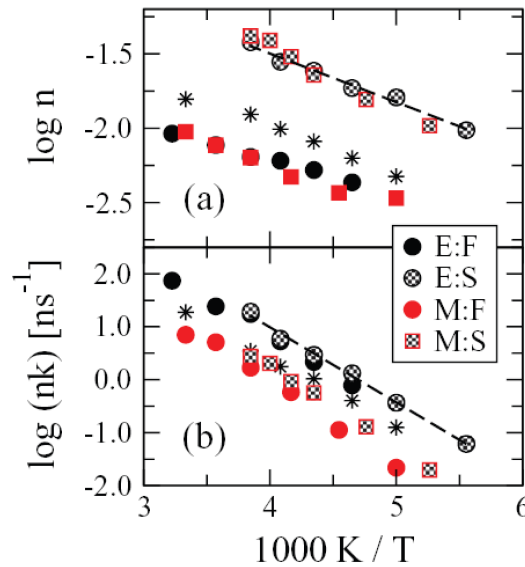


Abb. 5.3: Gezeigt sind die Temperaturabhängigkeiten a) des Fitparameters n und b) der Peak-Rate $k^{Peak} = nk$ für Fits nach dem Energielandschaftsmodell mit Gleichung (5.1) von Elastin (E) und Myoglobin (M). Die Parameter sind aus Fits der inkohärenten intermediären Streufunktion (S) und der Orientierungsautokorrelationsfunktion (F) gewonnen. Die Sterne zeigen die Daten aus Simulationen von 8ELA. Als gestrichelte Linien sind Arrhenius-Fits in beiden Abbildungen gezeigt. Die Aktivierungsenergie des Fitparameters n beträgt $E_a = 0.065$ eV, die Aktivierungsenergie der Peak-Rate beträgt $E_a = 0.28$ eV.

Für die verschiedenen Proteine und die verschiedenen Korrelationsfunktionen werden ähnliche Temperaturabhängigkeiten gefunden. Während die Peak-Rate $k^{Peak} = nk$ der Annahme einer temperaturunabhängigen Energielandschaft gerecht wird und für beide Proteine eine Aktivierungsenergie von 0.28 eV aufweist, stimmt die Vorhersage einer linearen Abhängigkeit des Exponenten n von der Temperatur gemäß Gleichung (2.19) nicht. Stattdessen wird eine exponentielle Abhängigkeit gefunden.

Die Temperaturabhängigkeit des Fitparameters ist wesentlich, um verschiedene Modelle zu unterscheiden. Die hier gefundene exponentielle Abhängigkeit des Parameters n von der Temperatur steht im Gegensatz zu der vom Energielandschaftsansatz vorhergesagten linearen Temperaturabhängigkeit. Die Aussagekraft der Fitparameter ist jedoch durch den bei längeren Zeiten stattfindenden Abfall eingeschränkt. Durch diesen Abfall kann die beobachtete Steigung des Potenzgesetz verstärkt worden sein. Der Energielandschaftsansatz lässt sich also noch nicht völlig ausschließen.

Insgesamt lassen sich die Rotations- und Translationskorrelationsfunktionen von Myoglobin und Elastin im intermediären Zeitbereich gut mit der aus dem Energielandschaftsbild folgenden Gleichung (5.1) anpassen. Allerdings zeigen die Fitparameter nicht die aus diesem Modell erwartete Temperaturabhängigkeit. Deshalb wird nun das nächste Modell, die Modenkopplungstheorie höherer Ordnung zur Beschreibung herangezogen.

Modenkopplungstheorie

Die Modenkopplungstheorie sagt einen logarithmischen Abfall der Korrelationsfunktionen in der Nähe einer Singularität höherer Ordnung voraus. Dieser Spezialfall der Modenkopplungstheorie wurde zuvor von Lagi et al. erfolgreich zur Beschreibung von MD-Daten des Proteins Lysozym verwendet. Dabei wurde eine gute Übereinstimmung mit der Theorie gefunden [156].

Der Interpretation von Lagi et al. folgend, dass das logarithmische Gesetz den Bereich der β -Relaxation beschreibt, an den sich eine strukturelle α -Relaxation anschließt, wird die intermediäre Streufunktion des Systems 8ELA mit Gleichung (2.22) für viele Streuvektoren q angepasst:

$$\Phi(t) \propto \left[f_q - H'_q \ln(t/\tau_\beta) + H''_q \ln^2(t/\tau_\beta) \right] \exp(-t/\tau_\alpha).$$

Dabei handelt es sich bei der Zuweisung der Begriffe α - und β -Relaxationen um Annahmen des Modells. Ob ein Protein diese beiden Prozesse aufweist, ist wie in Kapitel 2.3 eingeführt, unklar.

Die Fits sind in Abb. 5.4 bei der Temperatur 310 K zu sehen. Die Variation des Streuvektors überstreicht Werte von $q = 5 \text{ nm}^{-1}$ bis 95 nm^{-1} und damit Längenskalen von 1.2 nm - das entspricht etwa dem halben Proteindurchmessers - bis hinunter zu 0.066 nm, der halben Länge einer CH-Bindung.

Der anomale Abfall tritt bei allen Streuvektoren auf und an alle Kurven schließt sich für lange Zeiten ein exponentieller Abfall an. Für den Fit wurde die Zeitkonstante τ_β streuvektorunabhängig auf 100 ps gesetzt. Die q -Abhängigkeit der Relaxationszeit τ_α passt zur Annahme einer Diffusionsbewegung: $\tau_\alpha(q) \propto q^2$. Für große q ist der hintere Abfall jedoch so gering, dass große Unsicherheiten für τ_α resultieren. Die quadratische

Abhängigkeit des τ_α vom Streuvektor wurde daher in einem zweistufigen Fitverfahren festgesetzt.

Mit den so beschriebenen Fits lassen sich sowohl die Daten des Elastins als auch die etwas gestreckteren Daten des Myoglobins gut anfiten. Die Übereinstimmung der Fits hängt nicht vom genauen Wert von τ_β ab.

Die Werte der freien Parameter: der Ergodizitätsparameter f_q , und die Amplituden H'_q und H''_q sind in Abbildung 5.5 für Elastin bei verschiedenen Temperaturen zu sehen. Die Modenkopplungstheorie macht Vorhersagen für diese drei Parameter [156, 241].

- (1) Der Nichtergodizitätsparameter f_q ist unabhängig vom Kontrollparameter (hier der Temperatur), wenn das System in der Nähe einer Singularität ist,
- (2) die kritische Amplitude $H'_q > 0$ weist ein Maximum auf und lässt sich faktorisieren in einen q -abhängigen und einen q -unabhängigen Term: $H'_q = h(q)b(T)$. Folglich ist nur die Höhe, nicht aber die Position des Maximums als Funktion des Streuvektors q von der Temperatur abhängig.
- (3) H''_q ist bei kleinen Wellenvektoren negativ was einen konvexen Verlauf der Streufunktionen anzeigt, während es bei größeren Wellenvektoren durch positive Werte den konkaven Verlauf widerspiegelt [156].

Diese Vorhersagen werden nun anhand der freien Fitparameter in Abbildung 5.5(a) für Elastin und (b) für Myoglobin überprüft. Für hohe Temperaturen $T > 240 - 250$ K treffen diese Vorhersagen gut zu. Sowohl für Elastin als auch für Myoglobin liegen die Werte des Nichtergodizitätsparameter etwa übereinander, die Position des Maximums

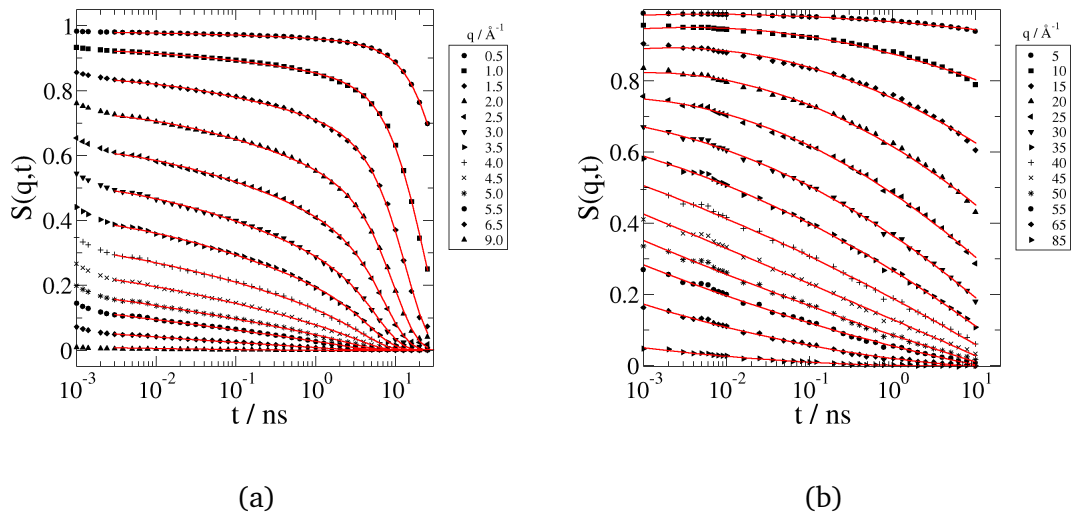


Abb. 5.4: Inkohärente intermediäre Streufunktion a) des 8ELA Systems bei 310 K und b) des Myoglobins bei 300 K für verschiedene Streuvektoren q . Die durchgezogenen Linien entsprechen Fits mit Gleichung (2.22).

von H'_q variiert kaum und H''_q weist einen Nulldurchgang auf. Aus dem Nulldurchgang lässt sich die Längenskala des beteiligten Prozesses berechnen [241]. Für Elastin ist die Längenskala bei 280 K: $2\pi/q(H'' = 0) \approx 1.25 \text{ \AA}$, der logarithmische Abfall wird folglich durch lokale Bewegungen verursacht. Mit sinkender Temperatur ist der Nulldurchgang bei größerem Streuvektor zu beobachten. Gemäß der Überlegung von Sciortino [241] lässt dies auf eine abnehmende Amplitude schließen.

Für tiefere Temperaturen wird die Abweichung von den durch die Modenkopplungstheorie vorhergesagten Eigenschaften der Fitparameter größer. Der Verlauf des Nichtergodizitätsparameters wird temperaturabhängig, ebenso wie das Maximum der Amplitude H'_q . Insbesondere weist auch H''_q keinen Nulldurchgang mehr auf, dieser erscheint zu großen q verschoben. Dies schränkt die Gültigkeit des Fits auf hohe Temperaturen ein.

Die Gültigkeit des Fits wird weiterhin dadurch eingeschränkt, dass die Analyse kritisch davon abhängt in welchem Zeitbereich Gleichung (2.22) an die Daten gefittet wird. Diese Beobachtung ist in Abbildung 5.6 am Beispiel des Fitparameters H'' für die wellenvektorabhängige Analyse der Streufunktionen von Elastin 8ELA bei 280 K gezeigt. Je nach Zeitraum verschiebt sich der konvex-zu-konkav-Übergang zu immer kleineren Zeiten oder verschwindet fast vollständig. Diese Abhängigkeit vom Fitbereich könnte von kleineren Oszillationen im Übergangsbereich zwischen intramolekularen Vibrationen und dem Beginn der β -Relaxation stammen. Die oben vorgestellte Analyse wurde

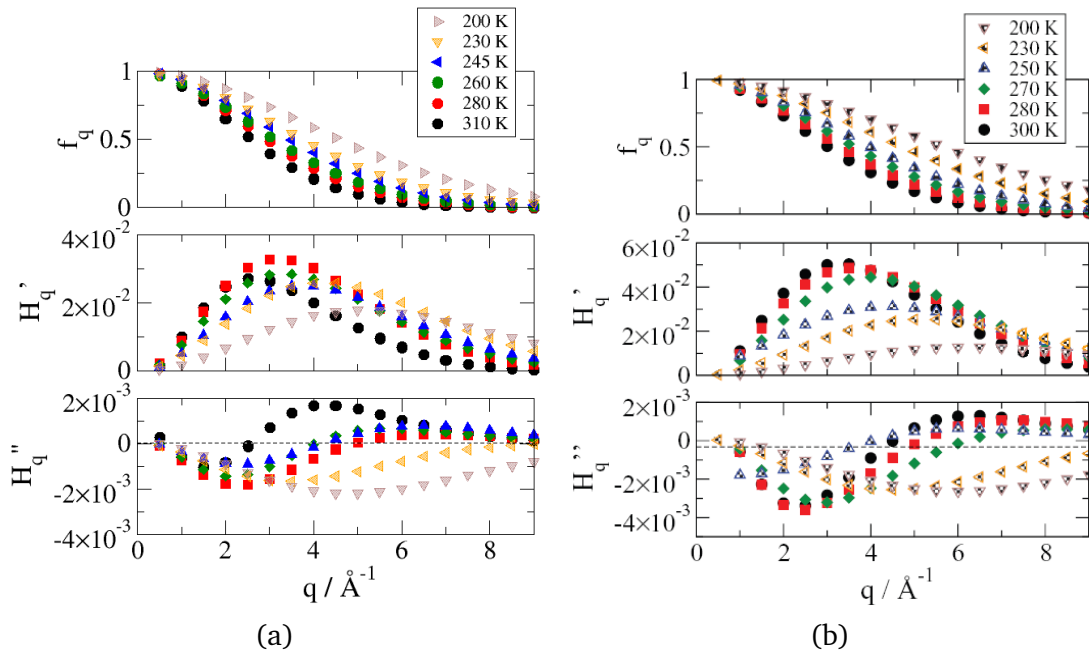


Abb. 5.5: Fitparameter für a) Elastin und b) Myoglobin als Funktion des Streuvektors q für verschiedene Temperaturen T .

im Zeitraum 1 ps bis 3.2 ns für Elastin und 1 ps bis 7.9 ns für die Myoglobin-Daten durchgeführt.

Zuletzt wurde eine weitere Vorhersage der MCT in der Nähe von Übergängen höherer Ordnung überprüft. Nach Sperl ist das MSD in der Nähe von Übergängen höherer Ordnung durch Subdiffusion gekennzeichnet und das Ausmaß der Subdiffusion, sprich die Steigung α , hängt vom Abstand $\epsilon = T - T_c$ zur Singularität ab [248]

$$\langle r^2 \rangle = A(t/\tau)^x \quad \text{mit } x \propto \sqrt{\epsilon}. \quad (5.3)$$

Die Steigung des MSD im intermediären Zeitbereich bei verschiedenen Temperaturen in Abbildung 5.7 weist jedoch keine sichtbare Temperaturabhängigkeit auf.

Treten wir einen Schritt zurück und rekapitulieren die physikalischen Annahmen der Modenkopplungstheorie: Ausgangspunkt der Analyse ist die Entwicklung der Modenkopplungstheorie für Singularitäten höherer Ordnung. Bei Übergängen höherer Ordnung gibt es zwei verschiedene Mechanismen des strukturellen Arrests (vgl. Kap. 2.2.2). Es bleibt unklar, welches neben der Hard-Core-Abstoßung der zweite Mechanismen des strukturellen Arrests in Proteinen sein kann. Analog zu den Beispielen sind in Kap. 2.2.2 könnten hierfür einerseits nichtkovalente Wechselwirkungen (z.B. Wasserstoffbrückenbindungen) in Frage kommen, andererseits könnte das Wasser ein Confinement für die Proteine darstellen, wenn es stark unterkühlt und glasartig wird. Unter der Annahme, dass es einen physikalisch plausiblen Erklärungsansatz für den zweiten Mechanismus des strukturellen Arrests gibt, können die Ergebnisse bewertet werden.

Die Modenkopplungstheorie höherer Ordnung gilt in der Nähe eines Flüssig-Glas-Übergangs. Der hintere Abfall wird in diesem Interpretationsansatz als α -Relaxation und der logarithmischen Abfall als β -Relaxation interpretiert. Die Fits wurden über

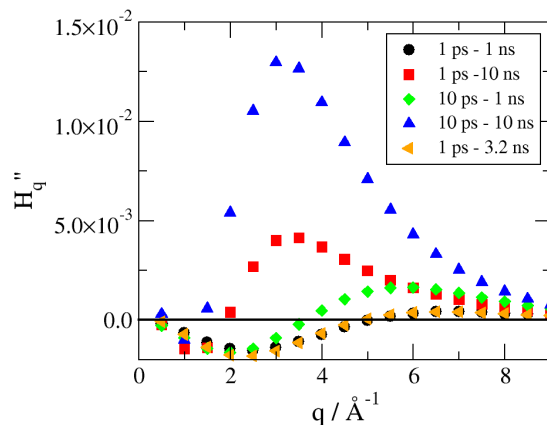


Abb. 5.6: Streuvektorabhängigkeit des Fitparameters H''_q für hydratisiertes Elastin bei 280 K.

den großen einen Temperaturbereich von 200-300 K durchgeführt. Die Annahme, dass sich das untersuchte System über den gesamten Temperaturbereich in der Nähe einer Singularität höherer Ordnung befindet, kann in Zweifel gezogen werden. Damit lässt sich erklären, dass die Analyse nur für einen kleineren Temperaturbereich zu Ergebnissen in Übereinstimmung mit den Vorhersagen führt (vgl. Abb. 5.5). Der Temperaturbereich, in dem die Modenkopplungsvorhersagen die Daten gut beschreiben, stimmt gut mit dem Temperaturbereich überein, in dem diese Übereinstimmung für Lysozym ebenfalls beobachtet wurde [156].

Unklar ist jedoch, weshalb bei tieferen Temperaturen größere Abweichungen von den Vorhersagen zu beobachten sind, als bei höheren Temperaturen. Wir haben es hier also mit einem sehr widersprüchlichen Bild zu tun. Einerseits nimmt unser Fit klar an, dass wir uns im flüssigen Bereich des Phasendiagramms befinden, folglich sollte eine Temperaturerniedrigung auf die Singularität zu führen, andererseits nimmt die Abweichung für niedrigere Temperaturen aber zu.

Die Analyse ergibt, dass sich die Modenkopplungstheorie höherer Ordnung zwar im Rahmen gewisser Temperaturen zum Fit der Daten anwenden lässt, die physikalische Interpretation jedoch schwierig ist.

Fraktionaler Ornstein-Uhlenbeck-Prozess

Zuletzt wurde die fraktionale Fokker-Planck-Gleichung mit einem harmonischen Potential, also der fraktionale Ornstein-Uhlenbeck-Prozess getestet. Dieser Teil der Auswertung wurde von Felix Klameth durchgeführt.

Ausgangspunkt der Analyse ist das MSD bei verschiedenen Temperaturen. Das MSD für einen fraktionale Ornstein-Uhlenbeck-Prozess geht aus Gleichung (2.27) nach Ersetzen des Faktors 2 durch den Faktor 6 hervor, um die Diffusion in drei Raumrichtungen zu berücksichtigen:

$$r^2(t) = 6\langle r^2 \rangle \left\{ 1 - E_\alpha \left[\left(\frac{t}{\tau} \right)^\alpha \right] \right\}. \quad (5.4)$$

Diese Gleichung wurde an die MSD-Daten des Elastins (vgl. Abb. 5.7(a)) im Temperaturbereich 200-260 K gefittet. Für höhere Temperaturen erstreckt sich der Bereich der subdiffusiven Dynamik über einen zu kurzen Zeitbereich, um gut gefittet zu werden.

Zunächst wird mit zwei freien Fitparametern, α und $\langle x^2 \rangle$ gefittet. Der Fitparameter τ wurde im gesamten Temperaturbereich auf $\tau = 0.4 \text{ ns}$ konstant gehalten. Der Fitparameter α wird temperaturunabhängig zu $\alpha = 0.16 \pm 0.02$ bestimmt. Schließlich wurden die Kurven mit nur einem freien Fitparameter $\langle x^2 \rangle$ angepasst. Da die übrigen Fitparameter temperaturunabhängig sind, enthält dieser Fitparameter die gesamte Temperaturabhängigkeit. Der Fit passt die Daten in einem weiten Temperaturbereich

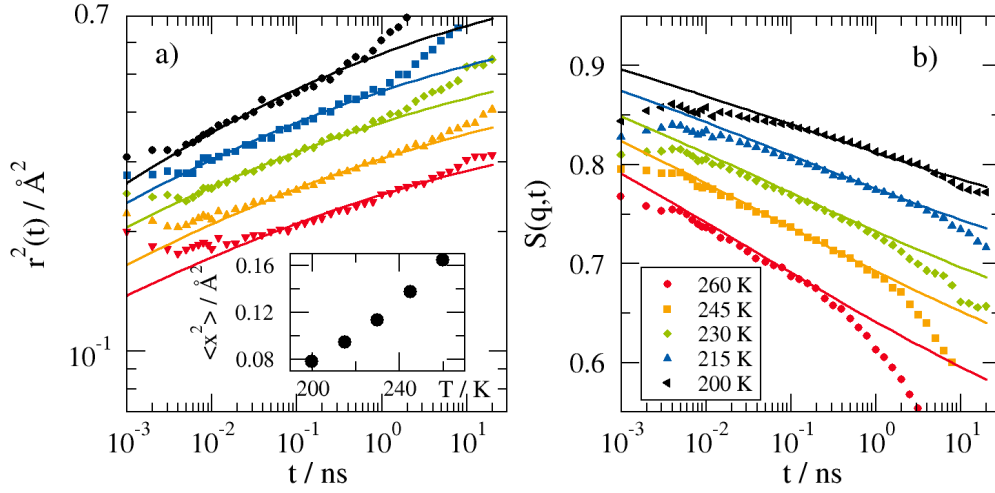


Abb. 5.7: a) Mittleres Verschiebungsquadrat und b) intermediäre inkohärente Streufunktion des Elastinmodells 8ELA. Die durchgezogenen Linien sind Fits mit Gleichung (2.27) (in a) und mit (2.28) (in b). Das Inset zeigt die Temperaturabhängigkeit der mittleren Verschiebungsquadrate.

(s. Abb. 5.7(a)) gut an. Für die mittlere quadratischen Positionsfluktuation $\langle r^2 \rangle$ wurde ein näherungsweise linearer Anstieg mit der Temperatur gefunden, wie das Inset in Abbildung 5.7(a) zeigt. Die lineare Temperaturabhängigkeit ist in Einklang mit der erwarteten Zunahme des MSD in einem harmonischen Potential.

Die anhand des mittleren Verschiebungsquadrats bestimmten Fitparameter α und $\langle r^2 \rangle$ wurden nun zur Beschreibung der intermediären Streufunktion verwendet und in Gleichung (5.5) eingesetzt

$$S(q, t) = \exp(-q^2 \langle r^2 \rangle) \sum_{n=0}^{\infty} \frac{q^{2n} \langle r^2 \rangle^n}{n!} E_{\alpha} \left[-n \left(\frac{t}{\tau} \right)^{\alpha} \right]. \quad (5.5)$$

Dabei wurde über $n \leq 5$ summiert. Diese berechneten und nicht gefitteten Kurven sind zusammen mit den Elastindaten in Abbildung 5.7(b) zu sehen. Die Übereinstimmung ist ausgesprochen gut. Dieselbe Analyse wurde für verschiedene q -Vektoren ausgeführt. Die Daten und die berechneten Streufunktionen sind in Abbildung 5.8 sehen.

Der fraktionale Ornstein-Uhlenbeck-Prozess erlaubt eine gute Anpassung der Daten unter Annahme eines harmonischen Potentials für die Bewegungen einzelner Teilchen. Diese Annahme wird durch die Untersuchung der Potentiale in Abschnitt 5.1.2 bestätigt.

Geringe Abweichungen von den Vorhersagen des fraktionalen Ornstein-Uhlenbeck-Prozesses treten jedoch zu Tage, wenn die Krümmung der Kurven der Streufunktion systematisch untersucht wird. Die Abweichung der Daten von einem logarithmischen Gesetz wird nun als Funktion der Zeit ausgewertet. Unter der Annahme, dass für den

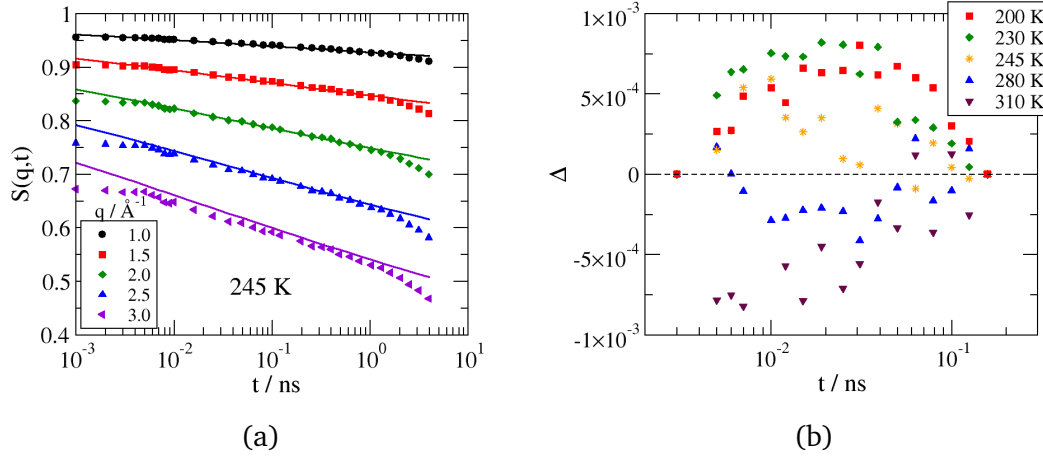


Abb. 5.8: a) $S(q, t)$ für Elastin bei $T = 245$ K für verschiedene Streuvektoren q . Die Linien sind Berechnungen der Streufunktion mit Gleichung (5.5) und den Fitparametern aus dem Fit der Daten in Abbildung 5.7 b) Differenz $\Delta(t)$ nach Gleichung (5.7) für Elastin 8ELA bei verschiedenen Temperaturen und $q = 25 \text{ nm}^{-1}$.

Zeitbereich der β -Relaxation von ca. 3 ps bis 150 ps die Streufunktion in der semi-logarithmischen Auftragung eine Gerade ist, so lässt sich ihr Abfall berechnen über:

$$L(t) = F_2(t_1) + [F_2(t_2) - F_2(t_1)] \frac{\ln(t) - \ln(t_1)}{\ln(t_2) - \ln(t_1)}. \quad (5.6)$$

Die Abweichung der berechneten Streufunktionen von dieser Annahme wird mittels des Parameters Δ evaluiert.

$$\Delta(t) = F_2(t) - L(t) \quad (5.7)$$

Δ ist für verschiedenen Temperaturen des Systems 8ELA in Abbildung 5.8(b) aufgetragen. Für $\Delta > 0$ ist die Krümmung der Streufunktion $S(q = 25 \text{ nm}^{-1}, t)$ konvex, $\Delta < 0$ zeigt ein konkaves Abweichen von einem linearen Verhalten in der semilogarithmischen Auftragung an. Die beobachteten Abweichungen von einer Gerade sind für alle Temperaturen klein ($< 10^{-3}$). Für tiefe Temperaturen ist die Krümmung deutlich konvex, bei $T = 245$ K nähert sie sich der Geraden an, bei hohen Temperaturen wird die Krümmung konkav.

Dieses Verhalten wird von dem fraktionalen-Ornstein-Uhlenbeck-Prozess nicht vorhergesagt. In der Modenkopplungstheorie höherer Ordnung wird zwar ein Übergang zwischen einer konkaven und einer konvexen Krümmung der Streufunktion erwartet, dieser tritt jedoch in Abhängigkeit vom Streuvektor auf (vgl. Abb. 5.5) und soll in der Nähe der Singularität näherungsweise temperaturunabhängig sein [249]. Die gefundene Temperaturabhängigkeit lässt sich folglich durch keinen der beiden Ansätze erklären.

Eine Änderung der Krümmung als Funktion der Temperatur könnte stattdessen durch einen breiten Relaxationsprozess hervorgerufen werden, der durch das Zeitfenster läuft. Bei tiefen Temperaturen wird die Langzeitflanke gemessen, die Krümmung ist folglich konvex, bei hohen Temperaturen schiebt die Kurzzeitflanke in das ps-ns-Zeitfenster und verursacht eine konvexe Krümmung der Streufunktion.

Vergleich der drei Ansätze

Der anomale Korrelationsabfall in Myoglobin und Elastin wurde mit drei verschiedenen Interpretationsansätzen ausgewertet: mit der β -Relaxation des Energielandschaftsbildes, mit einer Diffusion in einem rauen, harmonischen Potential und mit der β -Relaxation der Modenkopplungstheorie.

Der anomale Korrelationsabfall lässt sich im Bereich von ps bis ns in Rotations- und Translationskorrelationsfunktionen beobachten. Bei längeren Zeiten wird bei höheren Temperaturen ein zusätzlicher Relaxationsprozess beobachtet. Alle drei Ansätze stimmen darin überein, dass sie den anomalen Abfall als einen lokalen Relaxationsprozess beschreiben. Die Vorhersagen für das jeweilige Verhalten unterscheiden sich jedoch. Besonders wertvoll zur Unterscheidung sind die Vorhersagen zur Temperaturabhängigkeit der Steigung der Korrelationsfunktionen und des mittleren Verschiebungsquadrats.

Die Dynamik in den Proteinen Elastin und Myoglobin ist qualitativ sehr ähnlich. Auch stimmt die Modenkopplungsanalyse für Elastin mit den in der Literatur vorgestellten Werten des Lysozyms [156] gut überein. Der anomale Abfall ist folglich nicht proteinspezifisch. Darüber hinaus wurde der anomale Korrelationsabfall sowohl in niedrighydratisierten kurzen Peptiden als auch in niedrighydratisierten Polymeren gefunden. Diese Befunde lassen darauf schließen, dass der anomale Korrelationsabfall keine Eigenschaft von Proteindynamik, sondern vielmehr eine charakteristische Eigenschaft von dichten, ungeordneten Systemen ist.

Die Ergebnisse der Modelle im Einzelnen sind:

- Mit dem aus dem Energielandschaftsbild mit einer exponentiellen Verteilung der Energiebarrieren resultierenden Potenzgesetz für die Korrelationsfunktionen lassen sich die Daten im intermediären Zeitbereich gut anpassen. Abweichend von der Vorhersage einer linearen Temperaturabhängigkeit wird jedoch eine exponentielle Temperaturabhängigkeit des Exponenten n in Gleichung (5.1) gefunden.
- Die Anwendung der Modenkopplungstheorie höherer Ordnung sagt ein logarithmisches Verhalten im Bereich der β -Relaxation vorher. Mit der Vorhersage der MCT lassen sich die simulierten Daten im intermediären Zeitbereich gut anpassen. Weiterhin wird auch der hintere Abfall mit Gleichung (2.22) beschrieben. Die Analyse der Daten mit der Modenkopplungstheorie hängt jedoch sehr

stark davon ab, in welchem Zeitbereich die Auswertung vorgenommen wird. Dies schränkt die Aussagekraft der Interpretation ein. Darüber hinaus wurde die vorhergesagte Temperaturabhängigkeit des Exponenten nicht gefunden. Die Modenkopplungstheorie nimmt an, dass der hintere Abfall durch einen α -Prozess beschrieben werden kann. Wie später gezeigt, deuten die hier vorgestellten Simulationen auf eine andere Interpretation hin (vgl. Kap. 5.1.2).

- Zuletzt wurde der fraktionale Ornstein-Uhlenbeck-Prozess zur Beschreibung herangezogen. Im Rahmen dieses Ansatzes konnten mit Hilfe von zwei temperaturunabhängigen Fitparametern sowohl die Temperaturabhängigkeit des mittleren Verschiebungsquadrats und der intermediären Streufunktion als auch die Streuvektorabhängigkeit letzterer beschrieben werden. Die Temperaturabhängigkeit wird in diesem Modell allein durch die Fluktuation des mittleren Verschiebungsquadrats $\langle x^2 \rangle$ in einem harmonischen Potential hervorgerufen. $\langle x^2 \rangle$ variiert linear mit der Temperatur, in Übereinstimmung mit der Vorhersage für ein harmonisches Potential. Die genaue Form des Potentials der Stickstoffatome wird im folgenden Abschnitt berechnet.

Der fraktionale Ornstein-Uhlenbeck-Prozess und die Modenkopplungstheorie beschreiben wichtige Aspekte der Simulationsergebnisse. Allerdings kann keiner der Ansätze alle Phänomene im betrachteten Temperaturbereich erklären. Der gefundene Übergang der Krümmung der Kurven von konkav zu konvex, kann außer durch die Nähe zu einer Singularität höherer Ordnung auch durch eine breite β -Relaxation hervorgerufen werden, die sich durch das ps-ns Zeitfenster schiebt. In der hier verwendeten Version der MCT wird für den β -Peak jedoch eine nahezu temperaturunabhängige Position vorhergesagt [249], die Modenkopplungstheorie erklärt die beobachtete Temperaturabhängigkeit folglich nicht.

Über die oben gestellten Fragen hinaus, bleibt weiterhin sowohl der dem logarithmischen Abfall zu Grunde liegende Mechanismus unklar, wie auch der Ursprung des beobachteten Langzeitabfalls. Beides soll in den folgenden Abschnitten näher untersucht werden.

5.1.2 Informationen über mikroskopische Proteindynamik

Im vorangegangenen Abschnitt wurde die anomale Proteindynamik mit drei Modellen untersucht. Daraus ergeben sich weitere Fragen, die nun mit Hilfe von mikroskopischen Informationen weiter untersucht werden sollen:

- Wie sieht das effektive Potential der Atome im Zeitbereich des anomalen Abfalls aus?
- Was ist die Ursache des bei langen Zeiten auftretenden Abfalls der Korrelationsfunktionen?

Um diese Fragen zu beantworten, wird zunächst die mikroskopische Dynamik insbesondere mit Hilfe der Berechnung von Potentialen untersucht, anschließend wird der Langzeitabfall analysiert und schließlich die Korrelation der Bewegung entlang der Aminosäurekette ausgewertet.

Potentiale

Die Form des Potentials, das ein Atom im intermediären Zeitbereich exploriert, wird vom Energielandschaftsansatz und vom fraktionalen Ornstein-Uhlenbeck-Prozess als zeitunabhängig angenommen [141]. Diese Annahme kann überprüft werden, indem das Potential der mittleren Kraft $U(x)$ mittels Gleichung (5.8), wie in Kap. 3.4.3 beschrieben, aus den Trajektorien der Atome für verschieden lange Trajektorien berechnet wird

$$U(x - \bar{x}) = -k_B T \ln [P(x - \bar{x})] . \quad (5.8)$$

Das ensembledemittelte Potential $U(x - \bar{x})$ in x-Richtung für die Proteinstickstoffatome ist in Abbildung 5.9 dargestellt. Für kurze Zeiten wird es gut durch ein harmonisches Potential beschrieben. Für Zeiten, die außerhalb des Zeitbereichs anomaler Dynamik liegen, werden die Abweichungen von einem harmonischen Potential zunehmend größer, die Potentiale sehen näherungsweise dreieckig aus. Die großen Abweichungen von der mittleren Auslenkung bedeuten, dass die Langzeitrelaxation einsetzt und anharmonische Bewegung ermöglicht.

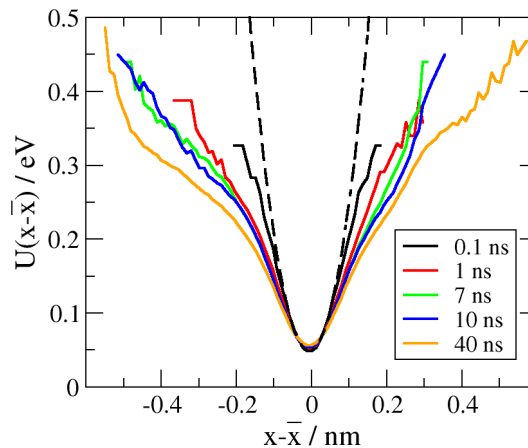


Abb. 5.9: a) Mittleres Potential $U(x - \bar{x})$ der Stickstoffatome von Elastin 8ELA als Funktion der Trajektorienlänge für $T = 310$ K.

Abbildung 5.9 zeigt, dass das Potential der mittleren Kraft mit längeren Zeiten zunehmend anharmonisch wird. Diese Potentiale sind Ensembledemittel. Weitergehende Informationen können durch die Untersuchung der Potentiale einzelner Atome gewonnen werden.

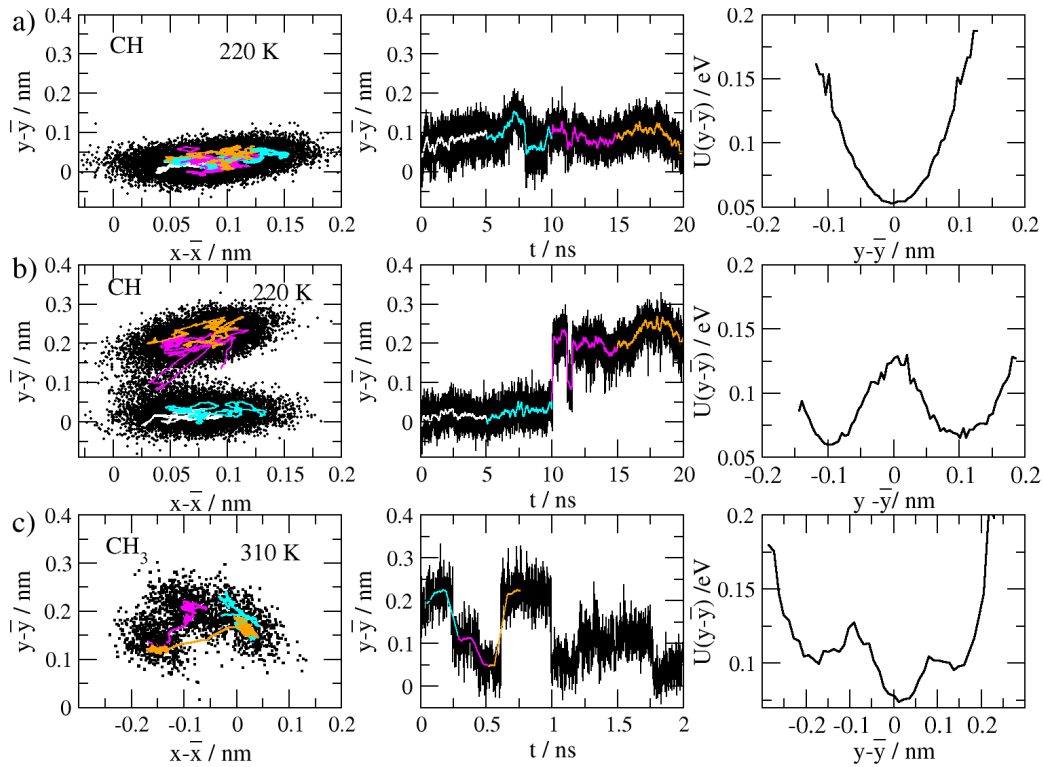


Abb. 5.10: Beispiele von Trajektorien a) eines Atoms, das keine Sprünge ausführt b) eines Atoms, das einen Sprung zu einem neuen Platz ausführt c) eines Atoms, das einen Dreiplatzsprung ausführt. Die erste Spalte zeigt die 2D-Darstellung der Trajektorie, die zweite Spalte zeigt die Zeitabhängigkeit der Trajektorie in 1D-Darstellung und in der dritten Spalte sind die zugehörigen Potentiale abgebildet. Die farbigen Kurven sind laufende Mittelwerte über 100 Zeitpunkte und sollen die Zuordnung von Spalte 1 und Spalte 2 erleichtern.

Bei der Berechnung der Potentiale einzelner Atome können verschiedene Trajektorien unterschieden werden. Drei typische Verhalten sind in Abbildung 5.10 gezeigt: (a) eine Trajektorie ohne Sprünge, (b) eine Trajektorie mit einem Sprung, (c) eine Trajektorie eines Dreiplatzsprunges, wie er für Methylgruppen typisch ist.

Die Spalten zeigen in der ersten Spalte die Projektion der Trajektorien in x-y-Richtung, in der zweiten Spalte die Trajektorien in y-Richtung als Funktion der Zeit und in der dritten Spalte das Potential. Die farbigen Linien zeigen den gleitenden Mittelwert über 100 ps. Sie dienen zur Veranschaulichung, des zeitlichen Verlaufs der Trajektorien in den Punktwolken der ersten Spalte. In allen Trajektorien lassen sich deutlich zwei Bewegungen unterscheiden: Vibrationsbewegungen und Sprungbewegungen.

Welchen Anteil haben nun die verschiedenen Trajektorienarten? Korreliert ihr Anteil mit dem Abfall der Streufunktion? Der Anteil der Trajektorienarten wurde in der Ba-

chelorarbeit von Kai Stroh [251] für PPO bestimmt. Dazu wurden die Potentiale der Einzelatome bis zu einem Wert des Potentials von $U(x - \bar{x}) = 0.1$ eV mit einem harmonischen Fit angepasst

$$U(x - \bar{x}) = A + kx^2 \quad (5.9)$$

und der Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung (root mean square error, RMSE) dieses Fits bestimmt. Im Ergebnis konnte für PPO gezeigt werden, dass die meisten Einzelpotentiale eine harmonische Form aufweisen, während jene, deren RMSE groß ist, eine Doppelmuldenform haben. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Zahl der Doppelmuldenpotentiale klein im Vergleich zu den harmonischen ist.

Diese Auswertung wurde für die Simulation des Proteins Elastin 8ELA-AA bei $T = 300$ K wiederholt und ist in Abbildung 5.11(a) gezeigt. Die untere rote Linie markiert die Kraftkonstanten der Potentiale für die einzelnen Stickstoffatome². In grün ist (oben) der RMSE-Wert aufgetragen. Die Abweichung von einem harmonischen Verhalten ist auch im Protein für die meisten der Potentiale sehr klein. Ist der Fehler des Fits groß (z.B. eingekreiste Werte), so sind die Potentiale meist Doppelmuldenpotentiale oder zumindest stark verbreitert. Aus den Doppelmuldenpotentialen lässt sich eine typische Sprunglänge l von ca. 0.1-0.2 nm ablesen (vgl. Abb. 5.10(b)).

Sarah Schneider bestimmte in ihrer Bachelorarbeit [240] daran anknüpfend die Verteilung der Kraftkonstanten k für Potentiale aus Simulationen verschiedener Länge und fand, dass eine Verteilung vorliegt, deren Mittelwert mit zunehmender Trajektorienlänge zu kleineren Werten, also breiteren Potentialen, verschiebt. Dies ist in Abb. 5.11(b) aufgetragen. Dieser Befund zeigt, dass die Form der Potentiale zeitabhängig ist.

Im Rahmen des Bildes eines fraktionalen Ornstein-Uhlenbeck-Prozesses, lässt sich diese Verschiebung der Kraftkonstantenverteilung mit zunehmender Länge der Trajektorie zu kleineren Werten wie folgt verstehen: Bei kurzen Zeiten exploriert ein Teilchen lediglich ein Unterminimum des rauen harmonischen Gesamtpotentials, für längere Zeiten wird der explorierte Bereich des Gesamtpotentials größer und strebt gegen den Grenze, den das harmonische Gesamtpotential vorgibt. Der mittlere explorierte Bereich ist durch Gleichung 5.4 für das mittlere Verschiebungsquadrat ausgedrückt. Daraus lässt sich über

$$\langle x^2 \rangle = \frac{k_b T}{k} \quad (5.10)$$

die Kraftkonstante des harmonischen Potentials berechnen [142], die als Grenzfall für lange Zeiten erwartet wird. Die aus Abb. 5.7 und Gleichung (5.10) für das harmonische Gesamtpotential ermittelte Kraftkonstanten sind in Abb. 5.10(d) aufgetragen und in Abb. 5.10(c) als senkrechte Linien für die jeweiligen Temperaturen markiert. In diesem Bild ist zu erwarten, dass die Verteilung der Kraftkonstanten sich mit zunehmender Länge verschmälert und gegen diesen Grenzfall strebt. Dies stimmt mit

² Ausgewertet wurde jeweils das Stickstoffatom des ersten Glycins in einem „VPGVG“-Monomer. Dadurch wurde der Aufwand die einzelnen Stickstoffatom zu adressieren minimiert.

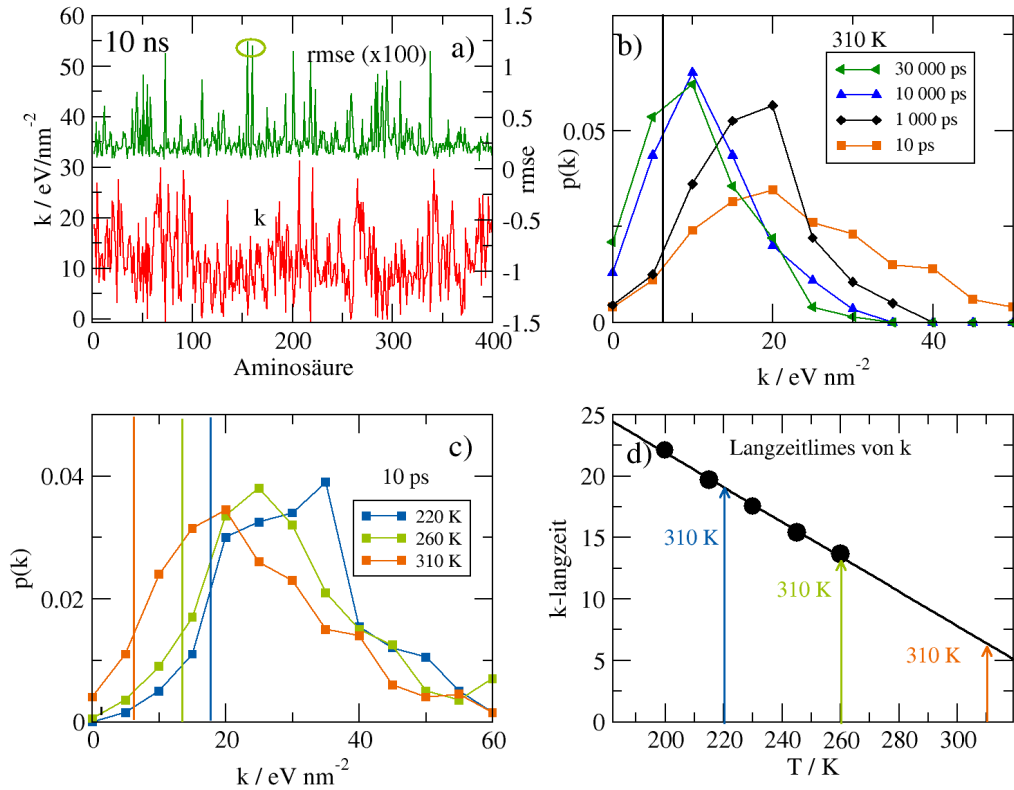
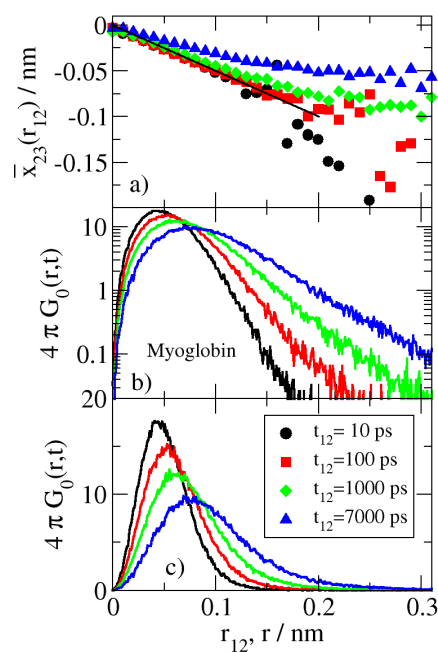


Abb. 5.11: Analyse der Kraftkonstanten a) Kraftkonstanten RMSE-Wert der Stickstoffatome im System ELA8 als Funktion der Aminosäure b) Verteilung der Kraftkonstanten aus Potentialen verschieden langer Trajektorien c) Verteilung der Kraftkonstanten aus 10 ps langen Trajektorien bei verschiedenen Temperaturen d) Langzeitlimit der Kraftkonstanten berechnet aus $\langle x \rangle$ aus Abb. 5.7.

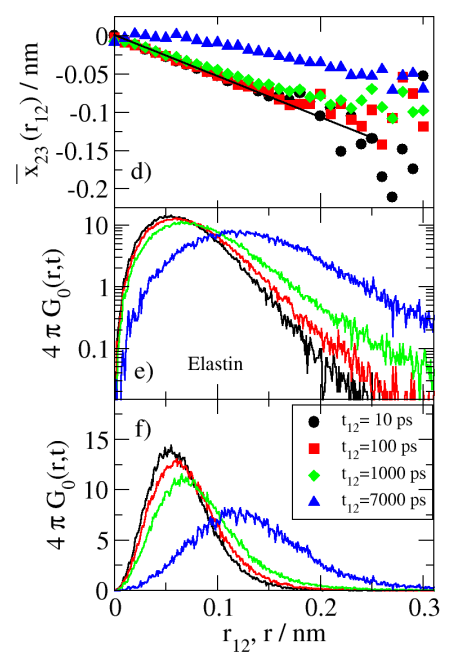
dem beobachteten Verlauf überein. Darüber hinaus wird in diesem Bild eine Verschiebung der Kraftkonstanten zu kleineren Werten mit steigender Temperatur erwartet. Auch diese Vorhersage wird von den Simulationsdaten gut wiedergegeben, wie in Abb. 5.10(c) gezeigt.

Eine weitere Bestätigung dafür, dass ein harmonisches Potential die Bewegung der Atome bei kurzen Zeiten dominiert liefert die Auswertung der bedingten Wahrscheinlichkeiten nach Gleichung (3.88). Wie in Abschnitt 3.4.3 erläutert, beschreibt diese Größe eine Korrelation zwischen den Richtungen der Bewegungen in den Zeitintervallen t_{12} und t_{23}

$$\bar{x}_{23}(r_{12}) = \left\langle \vec{r}_{23} \cdot \frac{\vec{r}_{12}^j}{r_{12}^j} (\delta(r_{12}^j - r_{12})) \right\rangle.$$



(a)



(b)

Abb. 5.12: a) Bedingte Wahrscheinlichkeitsfunktion mit $t_{23}=1$ ns und Van-Hove-Translationsfunktion in logarithmischer und linearer Darstellung für a)-c) Myoglobin bei 300 K und d)-f) Elastin bei 310 K. Die durchgezogenen Linien in a) und b) sind Geraden mit der Steigung $-1/2$.

Die bedingten Wahrscheinlichkeiten sind in Abbildung 5.12 für Myoglobin und Elastin jeweils für $t_{23} = 1$ ns und für verschiedene Zeiten t_{12} bei $T = 300$ K bzw. $T = 310$ K dargestellt. Ergänzend dazu sind in den Abbildungen 5.12(b,c,e,f) die nach Gleichung (3.85) berechnete van-Hove-Translationsfunktion aufgetragen.

Liegt ein harmonisches Potential vor, so weist die bedingte Wahrscheinlichkeit $\bar{x}_{23}(r_{12})$ eine Steigung von $-1/2$ auf [276]. Dies ist sowohl für Myoglobin als auch für Elastin zu sehen. Für r_{12} , die größer sind als eine typische Sprunglänge $r_{12} > l$, wird $\bar{x}_{23}(r_{12})$ konstant. Wird der Zeitabschnitt t_{12} länger gewählt, so treten für Elastin Abweichungen von der Steigung $-1/2$ auf. Solche Abweichungen sind für lange Zeiten zu erwarten, wenn ein Teilchen sich dem Grenzfall freier Diffusion annähert (erkennbar an der Gaußverteilung in der Van-Hove-Funktion in Abbildung 5.12(f)). In diesem Fall spüren die Teilchen den Effekt des lokalen Potentials nicht mehr und die Strecke r_{12} ist nicht mehr durch das Minimum des harmonischen Potentials vorgegeben.

Zum Vergleich mit der Translations-van-Hove-Funktion ist in Abbildung 5.13 die van-Hove-Orientierungsfunktion für Elastin (8ELA-AA) bei verschiedenen Temperaturen im Zeitbereich des anomalen Abfalls ($t = 500$ ps) an (s. Gl. (3.86)) gezeigt. Die Winkelverteilung weist einen exponentiellen Schwanz auf. Dies ist die Signatur von Bewegung in einem Käfig aus nächsten Nachbarn und wird für kurze Zeiten und tiefe Temperaturen auch in Bulkwasser gefunden (vgl. Abb. A.1). Wird dieser mit einer exponentiellen Funktion gefittet

$$P(\chi) = \frac{1}{\Gamma_0} \exp\left(-\frac{\chi}{\Gamma_0}\right), \quad (5.11)$$

so lässt sich der charakteristische Winkel Γ_0 bestimmen. Dieser ist in Abbildung 5.13(b) als Funktion der Temperatur aufgetragen.

Die Verteilung zeigt, dass der Hauptteil der Atome kleinwinklige Bewegungen ausführt und dass der charakteristische Winkel mit der Temperatur zunimmt. Die Ergebnisse aus der van-Hove-Orientierungskorrelationsfunktion wird in Kapitel 8 verwendet, um mit Hilfe von Random-Walk-Simulationen NMR-Spektren zu berechnen.

Langzeitabfall

An die im Abschnitt 5.1.1 charakterisierte anomale Dynamik, die auf einer Zeitskala von ps zu wenigen ns stattfindet, schließt sich ein stärkerer Abfall an. Dieser wird im Rahmen der Modenkopplungstheorie als α -Prozess interpretiert. In diesem Abschnitt soll die Ursache dieses Abfalls genauer untersucht werden.

Dazu wird der Schwingungsanteil der Simulation abgetrennt, indem wie oben beschrieben Kurzzeitsimulationen zu verschiedenen Zeitpunkten entlang der Trajektorie durchgeführt werden. Für jeden Punkt entlang der Trajektorie wird nun die Schwingungsbewegung durch Mittelung über 1000 Zeitschritte mit $\Delta t = 0.01$ ps entfernt. Für

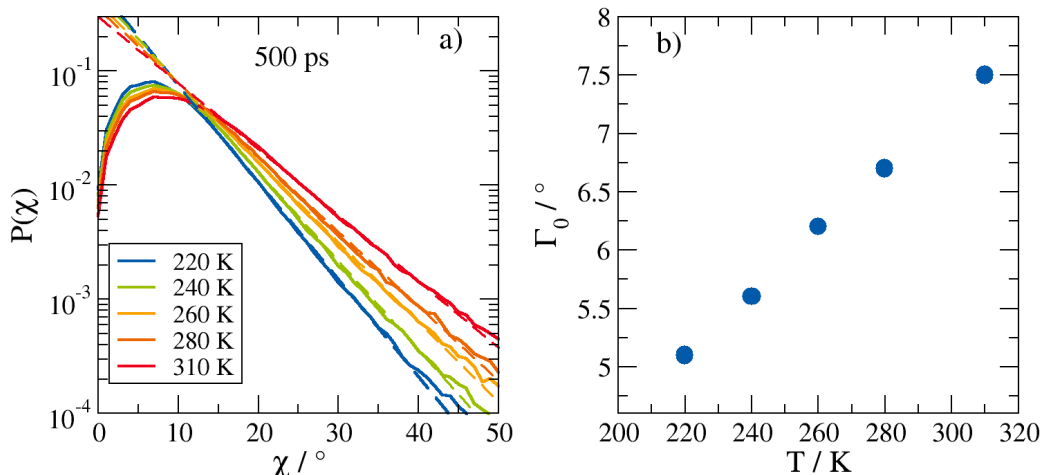


Abb. 5.13: Semilogarithmische Auftragung der Van-Hove-Orientierungskorrelationsfunktion für die C_α - H_α -Reorientierung bei $t = 500$ ps für verschiedene Temperaturen. Im hintere Teil ist mit einer Exponentialfunktion gefittet (gestrichelte Linien). Die aus dem Fit gewonnenen charakteristischen Winkel wurden temperaturabhängig in b) aufgetragen.

die so gewonnene mittlere Position der Teilchen wird nun sowohl das mittlere Verschiebungsquadrat (nach Gl. (3.84)) als auch die intermediäre inkohärente Streufunktion (nach Gl. (3.82)) berechnet.

Die erhaltenen Funktionen sind in Abbildung 5.14(a) für Elastin (8ELA-AA) aufgetragen. Zum Vergleich ist das normale MSD als durchgezogene Linie eingezeichnet. Über einen Zeitbereich von 30 ps bis 30 ns zeigt der Schwerpunkt eine Zeitabhängigkeit des MSD proportional zu $t^{1/2}$. Diese Abhängigkeit gilt sogar unterhalb des Schwingungsplateaus. In Abbildung 5.14(b) sind die Streufunktion, die ohne die sonst übliche Mittelung über viele Zeitaufpunkte gewonnen werden³, aber den Schwingungsanteil enthalten, als durchgezogene Linien abgebildet. Es ist zu erkennen, dass die beiden Größen für lange Zeiten zusammenfallen. Der hintere Abfall der Streufunktion wird folglich von der Schwerpunktsbewegung der Potentiale verursacht. Für Myoglobin wird dieselbe Zeitabhängigkeit mit $t^{1/2}$ gefunden (s. Abb. 5.15). Erneut zeigt sich, dass die Struktur des Proteins für die Dynamik im betrachteten Zeitbereich eine untergeordnete Rolle spielt.

Der Befund wirft neue Fragen auf. Wie kann dieses Potenzgesetz für das Langzeitverhalten des MSD erklärt werden? Die Proportionalität des MSD zu $t^{1/2}$ erinnert an Polymerdynamik im Rouse-Regime (vgl. Abb. 2.3). Um diese Ähnlichkeit zu demons-

³ In der üblichen Auswertung wird durch Verschiebung des Zeitaufpunktes entlang der Trajektorie eine Zeitmittelung durchgeführt. Für die begrenzte Zahl an Kurzzeitsimulationen ist dies nicht möglich. Deshalb wurde bei der Auswertung der Vergleichsfunktionen mit Schwingungsanteil darauf ebenfalls verzichtet.

trieren, ist in Abbildung 5.15(b) zusätzlich zu den MD-Simulationsdaten des Elastins bei $T = 370\text{ K}$, das experimentell mit Field-Cycling-NMR bestimmte MSD von Polybutadien bei $T = 393\text{ K}$ aus [226] aufgetragen. Die Daten wurden so gewählt, dass sowohl Molekulargewicht als auch Temperatur etwa übereinstimmen. Der qualitative Verlauf der beiden Substanzen ist sehr ähnlich.

Die in den Simulationen erhaltenen Werte des MSD sind um mehr als eine Größenordnung kleiner, als die experimentell erhaltenen Daten. Dies kann mehrere Ursachen haben. Zum einen wird hier die Dynamik von Protonen mit denen der schwereren Stickstoffatomen verglichen, das simulierte MSD von Rückgratprotonen (nicht gezeigt) weicht jedoch nur geringfügig von dem der Stickstoffatome ab. Zum anderen können auch unterschiedliche Auswertewege zu Abweichungen dieser Größenordnung führen (vgl. Abb. 2.8 und Fußnote 16, für ein Beispiel aus der Neutronenstreuung).

Die Dynamik des Polybutadiens lässt sich im Rahmen des Rouse-Modells erklären. Das Rouse-Modell (vgl. Kap. 2.1.2) sagt im Anschluss an das Schwingungsplateau ein Potenzgesetz für das MSD mit der Zeitabhängigkeit $t^{1/2}$ voraus. Im Übergangszeitbereich zwischen diesen beiden Regimen ist in der intermediären Streufunktion der α -Prozess des Polymers zu sehen, der einen gestreckt-exponentiellen Korrelationszerfall gemäß Gleichung (2.10) mit der Zeitkonstanten τ_α auf etwa $S(q, t) \approx 0.1$ bewirkt (vgl. Abb. 2.3). Daran schließt sich ein Potenzgesetz mit $t^{-0.5}$ an. Dieses Verhalten ist in den simulierten Streufunktionen nicht zu beobachten. Der Langzeitabfall in $S(q, t)$ kann somit nicht eindeutig als α -Prozess identifiziert werden.

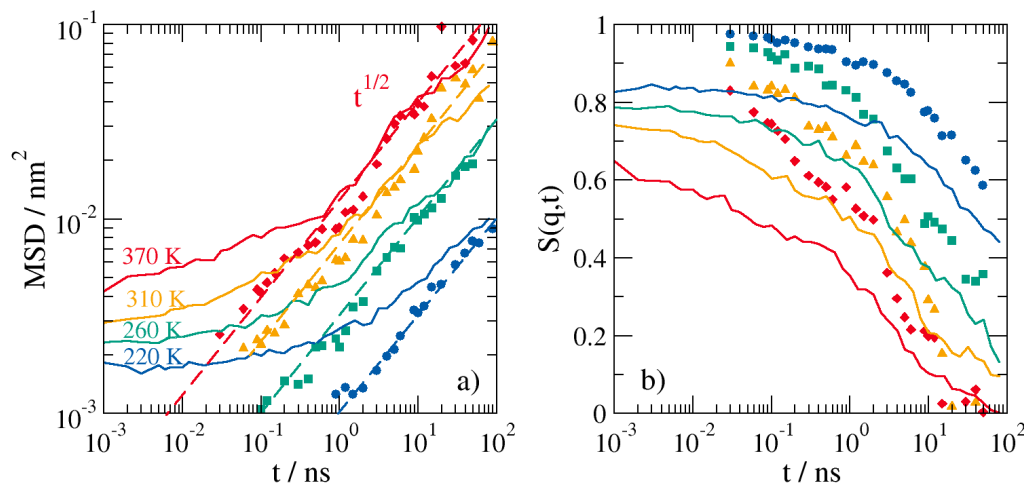


Abb. 5.14: a) Mittleres Verschiebungsquadrat der Stickstoffschwerpunkte des Elastins (8ELA_AA) (gemittelt über 10 ps), b) $S(q, t)$ der Stickstoffschwerpunkte. Zum Vergleich sind die nicht gemittelten Funktionen als Linien eingezeichnet. Die gestrichelten Linien zeigen Geraden mit der Steigung $1/2$ an.

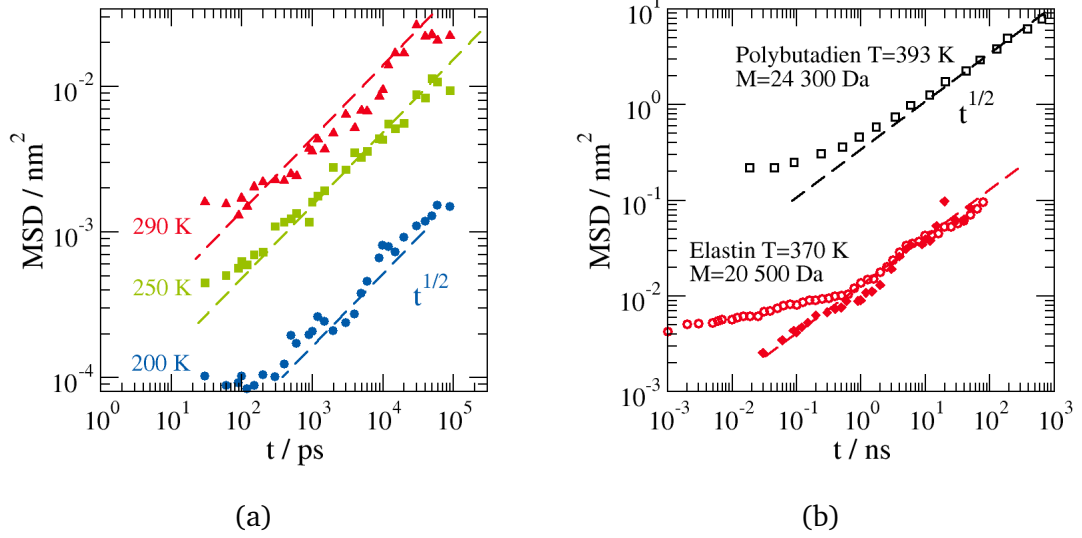


Abb. 5.15: a) Mittleres Verschiebungsqadrat der Schwerpunktsbewegung für Myoglobin zum Vergleich mit den Elastin Daten (b) Mittleres Verschiebungsqadrat von Elastin bei $T = 370$ K aus MD-Simulationen verglichen mit dem MSD aus Field-Cycling-NMR Messungen an Polybutadien ($M = 196000$ Da) bei $T = 393$ K aus [226].

Eine weiterführende Interpretation könnte mittels einer grundlegenden Analyse der Proteindynamik im Rahmen des Rouse-Modells möglich sein. In einer Arbeit von Neuisius et al. wurde eine solche Analyse für ein 11 Aminosäuren langes Peptid durchgeführt [192]. Der Zeitbereich in dem für lange Polymere (Entanglement) nach dem Rouse-Modell das Potenzgesetz $t^{1/2}$ gilt, wird im Rouse-Modell von der Rouse-Zeit [57]:

$$\tau_R = \frac{\xi b^2(N)^2}{3\pi^2 k_B T} \quad (5.12)$$

begrenzt. Hierin steht ξ für die Reibungskonstante, N für die Anzahl der Monomere. Die Rouse-Zeit wird in [192] für das Polypeptid GS₅W zu $\tau_R = 40$ ps abgeschätzt. Die in [192] gefundene $t^{1/2}$ -Zeitabhängigkeit erstreckt sich jedoch über den Bereich der Rouse-Zeit hinaus zu längeren Zeiten. Als mögliche Begründung führen die Autoren an, dass sich gefaltete Proteine nur schlecht mit einem linearen Kugel-Feder-Modell abbilden lassen, denn sie sind durch die intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen kompakter als gaußsche Knäuel [187]. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, wurden generalisierte Rouse-Modelle für Proteine entwickelt [55, 99, 100, 192], welche die Querverbindungen in Proteinen berücksichtigen. Diese generalisierte Rouse-Modelle sagen für das Ende des Potenzgesetzes eine längere Zeit voraus als das Rouse-Modell. Ob solche Modelle die vorliegenden Befunde erklären können, muss in weiteren Studien untersucht werden.

Zusammenfassung

Die am Anfang dieses Unterkapitels gestellten Fragen lassen sich mit Hilfe der vorgestellten mikroskopischen Analyse der Proteindynamik wie folgt beantworten:

(1) Ein Teilchen bewegt sich vornehmlich in einem harmonischen Potential. Dieses Potential ist zeitabhängig und temperaturabhängig. Die häufigste Bewegung der Proteinrückgrat-Atome ist eine kleinamplitudige Bewegung, deren Amplitude mit der Temperatur zunimmt. Ob ein rein homogenes Szenario vorliegt lässt sich anhand der vorgestellten Ergebnisse nicht entscheiden. Um ein heterogenes und ein homogenes Szenario zu unterscheiden, können Mehrzeitenkorrelationsfunktionen [26, 219] herangezogen werden.

(2) Die Proteindynamik wird bei kurzen Zeiten durch die Bewegung in einem lokalen, zeitabhängigen Potential beschrieben, dass sich als ein Explorieren des Käfigs der nächsten Nachbarn auffassen lässt und lässt sich somit als β -Prozess beschreiben. Die Schwerpunktsbewegung des lokalen Potentials führt zu einem MSD, das mit $t^{1/2}$ verläuft. Dieser Bewegungsprozess führt zum hinteren Abfall der Korrelationsfunktionen. Er ist allerdings nicht mit einer α -Relaxation zu erklären. Er ähnelt Erwartungen für das Rouse-Modell. Eventuell kann eine auf Proteine erweiterten Form des Rouse-Modells [55, 99, 100, 192] dieses Verhalten erklären.

Nachdem in diesem Abschnitt nun die Proteindynamik charakterisiert wurde, wird im nächsten Abschnitt auf die Dynamik des Hydratationswassers eingegangen.

5.2 Charakterisierung der Wasserdynamik in MD-Simulationen

Die Anwesenheit von Hydratationswasser erleichtert die Proteindynamik und -funktion (vgl. Kap. 2.3). Wasser an der Oberfläche eines Proteins zeigt gegenüber Bulk-Wasser ein verändertes dynamisches Verhalten. In diesem Abschnitt soll die Dynamik des Hydratationswassers kurz charakterisiert werden, bevor im darauf folgenden Kapitel das Zusammenspiel von Hydratationswasser und Protein genauer untersucht wird.

In Abbildung 5.16 ist die intermediäre inkohärente Streufunktion für ein System aus Bulkwasser und für das Hydratationswasser in einem System mit $h = 0.3 \text{ g/g}$ und 8 Elastinmolekülen gezeigt. In Bulkwasser (gestrichelte Linien) wird ein gestreckt-exponentieller Abfall der Korrelationsfunktionen (s. Abb. 5.16(a)) gefunden.

Dagegen zeigt sich im Hydratationswasser des Proteins bei langen Zeiten ein Potenzgesetzabfall. In Abbildung 5.16 ist neben der semilogarithmischen Darstellung auch die doppelt logarithmische Darstellung beider Systeme gezeigt. Es ist hierin deutlich zu erkennen, dass die inkohärente intermediäre Streufunktion des Wassers bei kurzen Zeiten durch den exponentiellen Anteil geprägt wird, während bei langen Zeiten ein Potenzgesetz-Abfall dominiert. Um dieses Verhalten deutlich erkennen zu können, ist

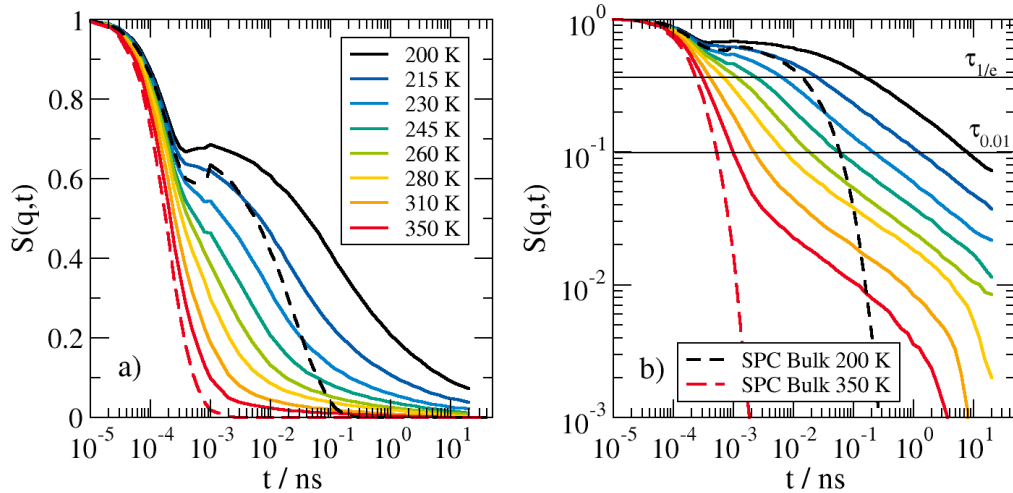


Abb. 5.16: Intermediäre Streufunktion für Wasser an 8ELA in a) linearer Darstellung b) logarithmischer Darstellung. Als gestrichelte Linien sind SPC Bulkwassersimulationen eingezeichnet.

die doppelt logarithmische Darstellung notwendig, sie wird im Folgenden weiter verwendet.

Im System 8ELA erscheint im Anschluss an das Potenzgesetz bei hohen Temperaturen ein weiterer exponentieller Zerfall im Zeitfenster. Es ist zu vermuten, dass die Wassermoleküle bei hohen Temperaturen und langen Zeiten den Grenzfall freier Diffusion erreichen, während sie bei tiefen Temperaturen und kürzeren Zeiten durch die umliegenden Proteine daran gehindert waren (vgl. MSD in Vogel [271]).

Um zu charakterisieren, welche Wassermoleküle für den Potenzgesetzabfall verantwortlich sind, werden Simulationen mit verschiedenen Hydratationsgraden herangezogen. Abbildung 5.17(a) zeigt die Streufunktion des Hydratationswassers an Elastin für verschiedene Hydratationsgrade. Hierin ist deutlich zu erkennen, dass der Korrelationsabfall mit zunehmenden Hydratationsgrad beschleunigt wird, bis bei $h = 9.2 \text{ g/g}$ nahezu das Bulk-Verhalten von Wasser reproduziert wird. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass das Potenzgesetz von den proteinnahen Wassermolekülen verursacht wird. Bei hohen Hydratationsgraden kommt das bulkähnliche Verhalten dadurch zu Stande, dass der Beitrag der Wassermoleküle an der Oberfläche des Proteins zur Streufunktion fast vernachlässigbar ist.

Diese Vermutung kann durch Auswertung der Streufunktion der Wassermoleküle als Funktion des Abstandes von der Wand bestätigt werden. Abbildung 5.17(b) zeigt die Streufunktionen des Wassers im System 8ELA mit $h = 0.3 \text{ g/g}$ für verschiedene Abstände zum Protein. Proteinnahe Moleküle zeigen das verlangsamte Verhalten, proteinferne Wassermoleküle zeigen nahezu Bulkverhalten.

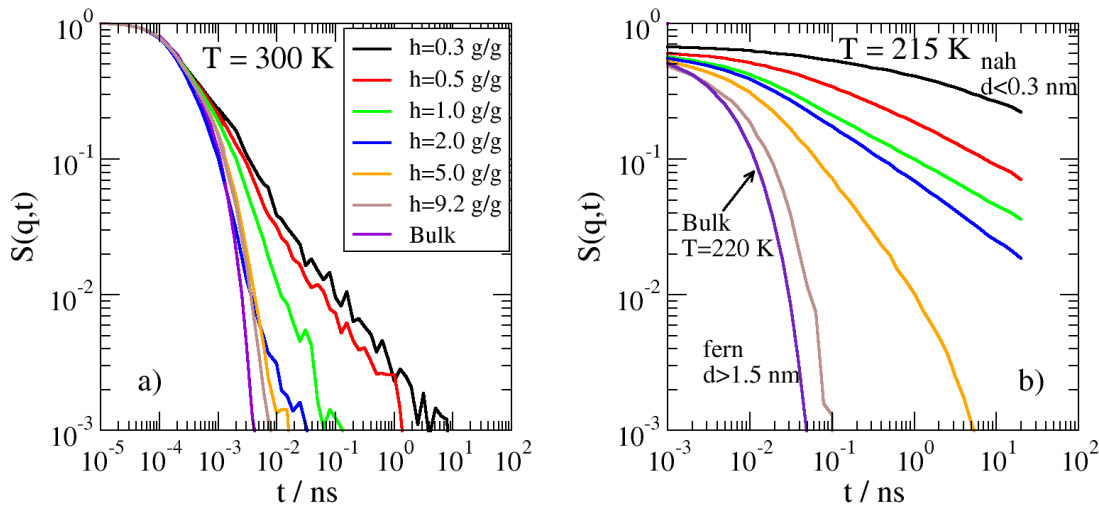


Abb. 5.17: Intermediäre Streufunktion a) in Abhängigkeit des Hydratationsgrades b) in Abhängigkeit vom Abstand zum Protein bei $T = 240$ K bei $h = 0.3$ g/g.

Die Wasserdynamik ist an der Oberfläche eines Proteins verlangsamt. Dieser Effekt wurde in MD-Simulationen für andere Oberflächen bereits beobachtet und genauer charakterisiert [140, 224]. Wir finden, dass die Steigung der Potenzgesetze vom Abstand der Wassermoleküle zur Oberfläche abhängt. Dies wurde auch für andere hydrophile und hydrophobe Oberflächen gefunden [155].

Die Oberfläche des Proteins hat demnach einen verlangsamen Einfluss auf die Wasserdynamik. Der Einfluss der Wasserdynamik auf die Proteindynamik wird im folgenden Abschnitt untersucht.

5.3 Zusammenspiel von Protein und Wasserdynamik

Das Zusammenwirken von Protein- und Wasserdynamik erleichtert, wie in Kapitel 2.3 am Beispiel des dynamischen Übergangs vorgestellt, die Bewegungen des Proteins. Umstritten ist bislang, welche Konzepte diese Kopplung am besten beschreiben. Das wohl bekannteste Modell für das Zusammenwirken von Wasser und Protein ist das Versklavungsmodell von Frauenfelder [73, 74, 78]. Dieses geht von einer einseitigen Kontrolle der Proteinbewegung durch die Wasserbewegung aus. Das Modell geht auf experimentelle Befunde zurück, in denen die Proteindynamik der Temperaturabhängigkeit des Wassers zu folgen scheint. In neueren Untersuchungen fanden Khodadadi et al. jedoch experimentelle Ergebnisse, die diesem Bild widersprechen [137]. In diesem Abschnitt soll nun mittels zweier Ansätze untersucht werden, welches Zusammenspiel zwischen Wasser und Proteindynamik besteht.

Zunächst wird der Einfluss der Variation des Hydratationsgrades auf die Proteindynamik untersucht. In Abbildung 5.17(a) wurde bereits gezeigt, dass ein höherer Hydratationsgrad bewirkt, dass eine größere Anzahl an Wassermolekülen sich bulkartig verhält. In Abbildung 5.18(a) ist nun die Streufunktion für die Proteinrückgratdynamik gezeigt. Mit höherem Hydratationsgrad nimmt die Korrelationszeit des Langzeitabfalls ab, der Zeitbereich über den sich der anomale Abfall erstreckt, verkürzt sich. Bei $h = 9.2 \text{ g/g}$ sind schließlich fast exponentielle Abfälle der Streufunktion zu beobachten.

Die Korrelationszeiten $\tau_{1/e}$ aus den Streufunktionen sind in Abbildung 5.18(b) in Abhängigkeit des Hydratationsgrades für verschiedene Systeme abgebildet. Die Daten für das Peptid VPGVG stammen aus den Simulationen des Peptids in der Masterarbeit von Alexander Janz [124]. Mit steigendem Hydratationsgrad nimmt die Korrelationszeit $\tau_{1/e}$ ab. Sie ist näherungsweise unabhängig vom simulierten System. Zusätzlich zu den Bulkwerten sind die Korrelationszeiten von Proteinen in Poren⁴ eingezeichnet. Diese sind gegenüber den Bulksystemen etwas verlangsamt. Für Hydratationsgrade $h > 5.0 \text{ g/g}$ wird der Grenzfall verdünnter Lösungen erreicht.

Mit Erhöhung des Hydratationsgrad setzt die Schwerpunktsbewegung des Proteins ein. In Gromacs kann die Trajektorie aller Atome um die Rotation und Translation des Gesamtmoleküls korrigiert werden. Die korrigierten Streufunktionen sind als gestrichelte Linien für $h = 0.3 \text{ g/g}$ und $h = 2.0 \text{ g/g}$ in Abbildung 5.18(a) eingezeichnet. Sie unterscheiden sich deutlich weniger als die unkorrigierten Streufunktionen. Ausgehend von der selben Vibrationsamplitude tritt die größte Abweichung im Zeitraum $t < 100 \text{ ps}$, d.h. im Zeitraum des anomalen Abfalls auf. Anschließend verlaufen die Kurven näherungsweise parallel. Die Menge des Hydratationswassers erleichtert demnach auch die interne Proteindynamik.

Wasser ermöglicht dem Protein sich als Gesamtmolekül zu bewegen, zu rotieren und zu translatieren. Darüber hinaus wird die interne Proteindynamik etwas beschleunigt. Ein durch Vorliegen von Bulkwasser zusätzlich einsetzender dynamischer Prozess, der von Frauenfelder vorgeschlagen wurde, kann in den vorliegenden Daten nicht identifiziert werden. Das von Frauenfelder vorgeschlagene Modell wurde für Myoglobin entwickelt, die Mehrzahl der hier vorgestellten Daten stammt aus Simulationen des Elastins. In den Abbildungen 5.1, 5.14, 5.15 und 5.18(b) sind jedoch die Simulationen von Myoglobin und Elastin verglichen und es kann kein qualitativer Unterschied festgestellt werden. Es ist daher zu erwarten, dass das Modell von Frauenfelder, sofern gültig, auch in den Simulationen von Elastin bestätigt würde.

In MD-Simulationen besteht die Möglichkeit das Lösungsmittel und das Protein an unterschiedliche Wärmebäder zu koppeln und somit als separate Systeme zu behandeln,

⁴ Im Rahmen dieser Arbeit wurden über die vorgestellten Systeme hinaus auch Simulationen von Proteinen in Confinement durchgeführt. Ein Elastinmolekül wird dabei in das Zentrum einer große Wasserbox gesetzt und alle Wassermoleküle in einem gewissen Radius zu einer Achse durch den Schwerpunkt des Moleküls mit einem starken harmonischen Potential „festgepinnt“. Die Porenereinstellung ist im Detail in der Masterarbeit von Felix Klameth beschrieben [139].

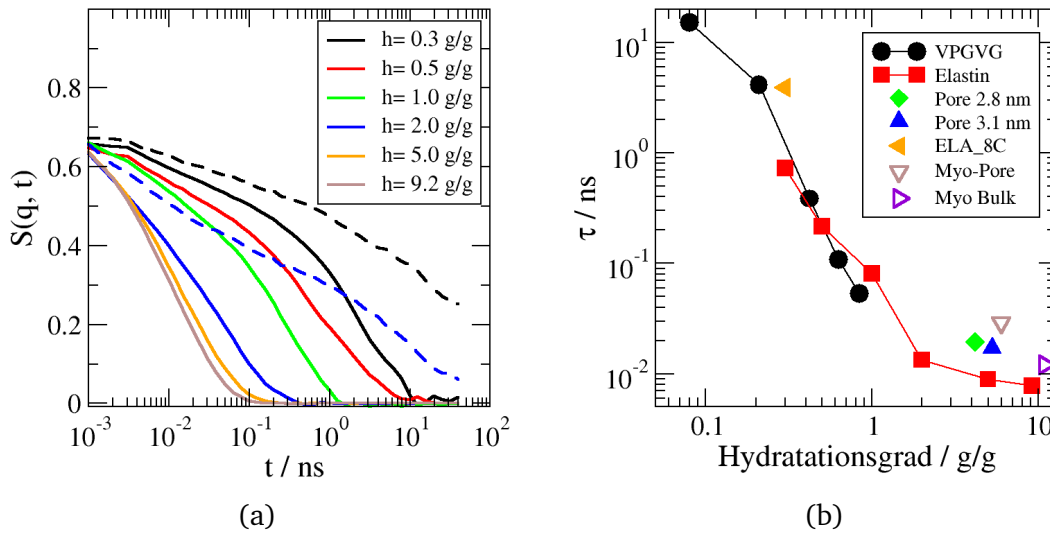


Abb. 5.18: Inkohärente intermediäre Streufunktion des Wassers in Abhängigkeit des Hydratationsgrades. Die gestrichelten Linien zeigen die um Rotation und Translation korrigierten Streufunktionen. In den gestrichelten Kurven ist somit der Einfluss des Wassers auf die interne Dynamik erkennbar. b) Bestimmung der Relaxationszeit an verschiedenen Systemen aus $S(q, t)$ ohne Abziehen der Schwerpunktsbewegung. Bei einem Hydratationsgrad von $h > 5.0$ g/g nähert sich die Relaxationszeit einem Plateauwert an, dem Grenzfall verdünnter Proteinlösungen.

die unterschiedliche Temperaturen aufweisen. Diese Art des Systems scheint zunächst unphysikalisch, ahmt jedoch experimentelle Systeme nach, in denen die Viskosität des Lösemittels geändert wird [267]. Damit lässt sich folglich der Effekt studieren, den die Veränderung der Wasserdynamik auf die Proteindynamik hat. Diese Art der Simulationen wurde in dieser Arbeit für ein Elastinmolekül hydratisiert mit $h = 0.3$ g/g durchgeführt. Das Proteinmolekül wurde dabei an ein Wärmebad mit $T = 300$ K gekoppelt, und die Temperatur des Wassers wurde variiert.

In Abbildung 5.19 sind die Streufunktionen (a) des Proteins und (b) des Wassers in einem solchen System aufgetragen. Die in offenen Symbolen ergänzten Daten zeigen den Vergleich zu Simulationen mit Wasser und Protein bei gleicher Temperatur. Betrachten wir zunächst die Proteindynamik in Abbildung 5.19(a). Die Änderung der Wassertemperatur führt zu einer starken Variation der Proteindynamik. Der Einfluss des Wassers äußert sich zum einen in der Änderung der Schwingungsamplitude. Zum anderen wird das Ausmaß des anomalen Abfalls erhöht. Der Zeitpunkt des Einsetzens des hinteren Abfalls (angedeutet durch die senkrechte Linie) wird durch die Änderung der Wassertemperatur nicht deutlich beeinflusst. Der größte Einfluss der Wassertemperatur besteht in der Änderung der Kurzzeitdynamik.

Auch die Proteintemperatur wirkt sich auf die Wasserdynamik (s. Abb. 5.19(b)) aus. In den Simulationen, in denen die Proteintemperatur höher ist, als die Wassertem-

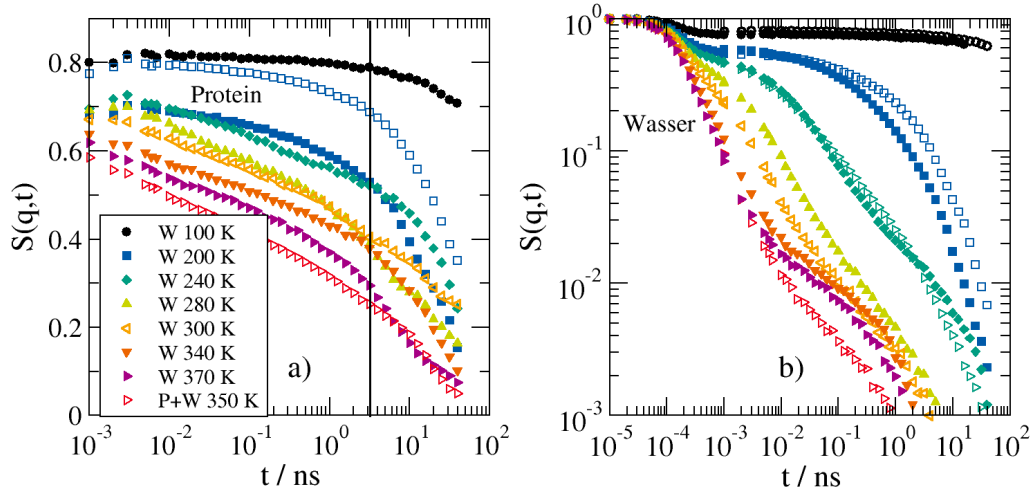


Abb. 5.19: Simulationen, bei denen die Temperatur des Wassers variiert wurde, während $T_{\text{Protein}} = 300\text{ K}$. a) Streufunktion des Proteins (ohne Rotation und Translation des Schwerpunkts) b) Streufunktion des Wassers.

peratur (z.B. W 220 K), ist die Wasserdynamik etwas beschleunigt, für die anderen Systeme (z.B. W 340 K) etwas verlangsamt. Der Einfluss der Proteintemperatur auf die Wasserdynamik ist verglichen mit dem Einfluss der Wassertemperatur auf die Proteindynamik schwach. Dass ein solcher Einfluss zu beobachten ist, spricht jedoch gegen eine einseitige Abhängigkeit der Proteindynamik von der Wasserdynamik.

In der Literatur finden sich ähnliche Arbeiten, bei denen Wasser und Protein auf unterschiedliche Temperaturen gesetzt wurden [132, 259, 267]. In der Arbeit von Tournier [259] wurde gefunden, dass der dynamische Übergang bei Variation der Wassertemperatur beobachtet wird, aber nicht bei Variation der Proteintemperatur, wenn Wasser eine konstante tiefe Temperatur hat. Auch Vitkup et al. [267] führten ähnliche Simulationen durch. Sie beobachten, dass die Proteindynamik im System mit $T_{\text{Protein}} = 300\text{ K}$ und $T_{\text{Wasser}} = 180\text{ K}$, dem System $T_{\text{Protein}} = T_{\text{Wasser}} = 180\text{ K}$ gleicht. Aus beiden Arbeiten wird gefolgert, dass die Proteindynamik einseitig durch die Wasserdynamik beeinflusst wird. Diese Folgerungen können mit den in dieser Arbeit durchgeführten Simulationen nicht bestätigt werden.

Die in den vorangegangenen Abschnitten vorgestellten Simulationen stammten aus vier verschiedenen Systemen: (1) 1ELA, (2) 8ELA, (3) 1ELA mit verschiedenen Hydratationsgraden und (4) 1ELA bei verschiedenen Wassertemperaturen. Für die simulierten Systeme können nun die Korrelationszeiten des Wassers mit denen des Proteins verglichen werden. Dafür muss zunächst eine geeignete Bedingung zum Ablesen der Korrelationszeit gefunden werden. Dies ist notwendig, weil die Streufunktionen nichtexponentiell abfallen (vgl. Abb. 5.16(b)). Üblicherweise wird die Korrelationszeit τ als $\tau(S(q, t) = 1/e)$ verwendet. Im Hydrationswasser bildet sich jedoch bei langen Zeiten durch die nahe am Protein sitzenden Wassermoleküle ein Langzeitschwanz

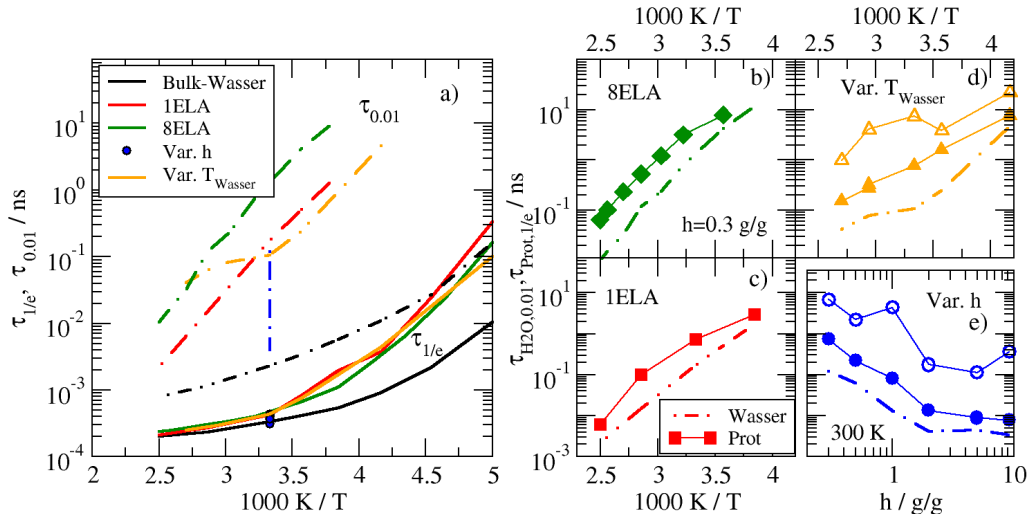


Abb. 5.20: a) Korrelationszeiten des Wassers bei $S(q, t) = 1/e$ ($\tau_{1/e}$ durchgezogene Linien) und bei $S(q, t) = 0.01$ ($\tau_{0.01}$ gestichelte Linien). b-e) Vergleich der Korrelationszeiten des Wassers ($\tau_{0.01}$) mit den Korrelationszeiten des Proteins (ausgefüllte Symbole ohne Korrektur um Schwerpunktsbewegung, offene Symbole mit Korrektur um Schwerpunktsbewegung des Proteins) b) für das System 8ELA, c) für das System 1ELA, d) unter Variation der Wassertemperatur, e) unter Variation des Hydratationsgrades.

aus. Dessen Temperaturabhängigkeit kann besser erfasst werden, wenn die Korrelationszeiten bei $S(q, t) = 0.01$ ps abgelesen werden. Beide Korrelationszeiten, $\tau_{1/e}$ und $\tau_{0.01}$, sind in Abbildung 5.20(a) für das Wasser in den verschiedenen Protein-Wasser-Systemen und für Bulkwasser gezeigt.

Während Bulkwasser unabhängig vom Ablesewert eine Vogel-Fulcher-Temperaturabhängigkeit aufweist, wird die Temperaturabhängigkeit in der Nähe der Proteinoberfläche zunehmend arrheniusartig. Diese Beobachtung steht in Einklang mit der Abstandsabhängigkeit der Wasserkorrelationszeiten, wie sie in Simulationen von Wasser in Confinements gefunden wurde [140]. Bei tiefen Temperaturen ist ein leichtes Sub-Arrhenius-Verhalten zu beobachten. Es ist unklar, ob dies ein echter Effekt ist, oder möglicherweise durch unzureichende Äquilibrierung [91] hervorgerufen wird.

Nun können die Korrelationszeiten des Wassers mit denen des Proteins verglichen werden. In den Abbildungen 5.20(b-e) sind die $\tau_{0.01}$ -Zeiten des Wassers den Korrelationszeiten $\tau_{1/e}$ des Proteins, die den Langzeitabfall widerspiegeln, gegenübergestellt. Die Korrelationszeiten des Proteins und des Oberflächenwassers verlaufen für alle Systeme näherungsweise parallel. Diese Abbildung verdeutlicht, dass die Dynamik des Proteins und des Oberflächenwassers eng gekoppelt sind. Die Kopplung von Proteindynamik an die Dynamik des Oberflächenwassers wurde sowohl von Frauenfelder [74, 79] als auch von Doster [65] beobachtet. Während Doster jedoch eine Vogel-Fulcher-Temperaturabhängigkeit beobachtet, sieht Frauenfelder eine Arrhenius-Temperaturabhängigkeit. Die hier gefundene Temperaturabhängigkeit ist in

Übereinstimmung mit dem Modell von Frauenfelder. Dennoch stimmen die aus MD-Simulationen erhaltenen Daten nicht mit dem Versklavungsmodell von Frauenfelder überein, da die beobachtete Abhängigkeit der Dynamik von Wasser und Protein wechselseitig und nicht, wie in dem Modell vorgeschlagen, einseitig ist.

Zusammenfassend zeigen die in diesem Abschnitt präsentierten Ergebnisse, dass die Proteindynamik stark von der Wasserdynamik abhängt, allerdings auch das Wasser von der Proteindynamik beeinflusst wird. Die MD-Simulationen an verschiedenen Systemen bestätigen, dass die Korrelationszeiten des Proteins parallel zu denen der Oberflächen-Wassermoleküle verlaufen. Für die Temperaturabhängigkeit wird hier ein näherungsweise ein Arrhenius-Verhalten gefunden.

5.4 Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Kapitel wurden die Dynamik von Protein und umgebenden Hydrationswasser mit MD-Simulationen untersucht. Die Untersuchung gliederte sich in drei Abschnitte, zunächst wurde die Proteindynamik untersucht, dann die Wasserdynamik vorgestellt und zuletzt die Kopplung zwischen beiden diskutiert.

Die Korrelationsfunktionen des Proteins zeigen im intermediären Zeitbereich einen anomalen Abfall. Dieser wurde im ersten Teil des Kapitels mit drei theoretischen Ansätzen, dem Energielandschaftsmodell, der Modenkopplungstheorie und dem fraktionalen Ornstein-Uhlenbeck-Prozess, beschrieben. Alle drei Ansätze schlagen Fitfunktionen vor mit denen die Korrelationsabfälle im Zeitbereich des anomalen Abfalls gut beschrieben werden können. Der fraktionale Ornstein-Uhlenbeck-Prozess weist die beste Übereinstimmung auf, da es das einzige der Modelle ist, dessen Temperaturvorhersage mit den MD-Daten übereinstimmt. Eine ausführlichere Diskussion und Literatureinordnung ist am Ende des Abschnitts gegeben.

Bei der Untersuchung der mikroskopischen Proteindynamik wurde festgestellt, dass die Dynamik der Proteinatome im Zeitbereich des anomalen Abfalls durch ein vorwiegend harmonisches Potential dominiert ist. Die Korrelation der Kraftkonstanten der Potentiale für einzelne Atome zeigt, dass das Potential zeit- und temperaturabhängig aufweitet. Auch diese Beobachtungen lassen sich unter der Annahme eines rauen harmonischen Potentials im Rahmen des fraktionalen Fokker-Planck-Ansatzes erklären.

Der hintere Abfall der Proteinkorrelationsfunktionen lässt sich auf eine subdiffusive Schwerpunktsbewegung der Potentiale zurückführen. Er geht einher mit einem Anstieg des MSD mit $t^{0.5}$. Diese Zeitabhängigkeit weckt die Vermutung, dass sich die Proteindynamik im Rahmen des Rouse-Modells oder generalisierter Rouse-Modelle beschreiben lässt. Eine solche Analyse könnte zukünftig zur Interpretation der Proteindynamik in diesem Zeitbereich herangezogen werden.

Bei der Untersuchung der Dynamik des Wassers wurde gefunden, dass die Dynamik des Wassers vom Abstand der Moleküle zur Proteinoberfläche abhängt. Die Korrelationsfunktion des Hydratationswassers zeigt für lange Zeiten einen Potenzgesetzschwanz, dessen Steigung temperaturunabhängig ist.

Zwischen der Dynamik der oberflächennahen Wasseratome und der Proteindynamik besteht eine enge Kopplung, die Korrelationszeiten beider Subensembles verlaufen in Abhängigkeit der Temperatur parallel zueinander. In Simulationen mit getrennten Wärmebädern für Protein und Wasser kann gezeigt werden, dass die Kontrolle nicht einseitig durch das Wasser ausgeübt wird, sondern eine gegenseitige Kopplung zwischen Protein und Wasserdynamik besteht. Dies spricht gegen das einseitig wasserdominierte Versklavungsmodell von Frauenfelder [73]. In Kapitel 8 wird näher darauf eingegangen, welche Konsequenzen dieses Bild für den dynamischen Übergang hat.

6 Untersuchung der Protein- und Wasserdynamik mit ^2H -NMR-Spektroskopie

In diesem Kapitel wird die Untersuchung eines vollständig deuterierten Proteins mit Festkörper- ^2H -NMR-Spektroskopie vorgestellt. Die Methode wird eingesetzt, um die Dynamik in einem Zeitfenster von mehr als neun Größenordnungen zu erfassen und Informationen über Bewegungsgeometrie und Bewegungsamplitude zu erhalten. Dabei wird ausgenutzt, dass es mit ^2H -NMR-Spektroskopie möglich ist, dynamisch unterschiedliche Deuteronen zu unterscheiden. In dieser Untersuchung wird die schnelle Methylgruppenbewegung von der Rückgratbewegung eines Proteins abgetrennt und die Rückgratbewegung als Funktion des Hydratationsgrad näher untersucht. Ein Teil der Messungen wurden wie in Kap. 4 erläutert, in der Masterarbeit von Beke Kremmling [147] durchgeführt.

Im ersten Abschnitt des Kapitels werden Ergebnisse der Experimente vorgestellt und die Temperaturabhängigkeit der Proteinrückgratbewegung charakterisiert. Es wird eine kleinamplitudige Bewegung gefunden, die sich mit einem Konusmodell beschreiben lässt. Im zweiten Abschnitt werden dann verschiedene Bewegungsmodelle mit Random-Walk-Simulationen untersucht und mit der Temperaturabhängigkeit der experimentellen Ergebnisse verglichen.

Auch über die Dynamik des Hydratationswasser lassen sich mit ^2H -NMR-Spektroskopie Informationen gewinnen. Untersuchungen hierzu wurden in der AG Vogel bereits in vorangegangenen Arbeiten durchgeführt [173–175, 223, 225]. Am Hydratationswasser wurden daher keine eigenen Messungen durchgeführt, im letzten Abschnitt ist stattdessen der Stand der Literatur zur Charakterisierung der Wasserdynamik an Proteinen mit NMR-Spektroskopie detaillierter vorgestellt. Eine Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse schließt das Kapitel ab.

6.1 Charakterisierung der Rückgratbewegung von deuteriertem Cyano-Phycocyanin

In den ^2H -NMR-Experimenten wird das vollständig deuterierte Protein Cyano-Phycocyanin (CPC) verwendet. Die Probenpräparation und die charakteristischen Eigenschaften der Probe sind in Kap. 4.2 beschrieben. Ziel der Untersuchung ist es, die Rückgratdynamik in Abhängigkeit von der Hydratisierung im vollen zugänglichen Zeitbereich der Methode zu charakterisieren.

Dazu werden drei Methoden der NMR-Spektroskopie kombiniert: Spin-Gitter-Relaxationszeitmessungen und Messungen von Spektren sowie von Rotationskorrelationsfunktion mittels Stimulierten-Echo(STE)-Experimenten. Die Ergebnisse werden jeweils in einem eigenen Unterkapitel vorgestellt. Die Kombination der Methoden erlaubt es die Rückgratbewegung des Proteins zu charakterisieren und ein Modell für die Temperaturabhängigkeit der Bewegung zu finden. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in [131] publiziert.

Das Protein CPC wurde zuvor bereits mit MD-Simulationen [56], Neutronenstreuung [45, 60, 86] und Lochbrenn-Spektroskopie [144, 145] untersucht. Untersuchungen mit ^2H -NMR-Spektroskopie fehlen jedoch bisher. Diese Untersuchungen zeigen ein Einsetzen von Dynamik in hydratisiertem CPC je nach verwendeter Energieauflösung bei 220 – 240 K [45]. Ein solches Einsetzen von Proteindynamik wurde auch in vorherigen ^{13}C -NMR-Studien am Protein Elastin gefunden. Trockenes Elastin dagegen zeigt kein Einsetzen von Dynamik bei ähnlicher Temperatur [175].

6.1.1 Messungen von Spektren

Mit der Messung von ^2H -NMR-Spektren des untersuchten Proteins CPC kann die Rotationsdynamik von C- ^2H -Bindungen untersucht werden. Die temperaturabhängige Änderung der Form der Spektren, parametrisiert durch die spektrale Breite $\bar{\delta}/\delta$ und die relative zentrale Intensität R/H , gibt dabei Aufschluss über die Bewegung. Besonders sensitiv ist diese Methode auf Änderungen der Dynamik, wenn die Korrelationszeit der Bewegung $\tau_c \approx 1\mu\text{s}$ ist. Nähere Erläuterungen zur Methode sind in Kapitel 3.2.3 zu finden.

Die Spektren wurden mit einer Solid-Echo-Pulsfolge aufgenommen. Der Pulsabstand der abgebildeten Spektren beträgt soweit nicht anders angegeben $\Delta = 20\mu\text{s}$. In Abbildung 6.1 sind Spektren von (a) trockenem und (b) mit $h = 0.3\text{ g/g}$ hydratisiertem CPC gezeigt. Sie weisen eine Doppelpakeform auf. Das schmalere Spektrum stammt von den Methylgruppen [13]. Durch die schnelle Dreiplatzsprungbewegung der Methyldeuteronen mittelt sich die Quadrupolwechselwirkung teilweise aus, und es ergibt sich ein auf $\bar{\delta} = 1/3\delta \approx 2\pi \times 40\text{ kHz}$ verschmälertes Spektrum. Die Rückgratdeuteronen verursachen das breite Pake-Spektrum. Im Fokus dieser Analyse stehen die Rückgratanteile, die Methylgruppendifynamik wird folglich nicht näher betrachtet.

Die Abbildung 6.1 zeigt Spektren bei vier verschiedenen Temperaturen. Die Breite der Spektren ändert sich kaum. Dies ist in Abb. 6.2 zu erkennen: Für die hydratisierte Probe (ausgefüllte Kreise) ändert sich die spektrale Breite $\bar{\delta}/\delta$ zwischen 160 K und Raumtemperatur (300 K) nur um etwa 5%. Das Spektrum der trockenen Probe verschmälert sogar noch weniger. Für tiefe Temperaturen nimmt die spektrale Breite in beiden Proben ihren statischen Wert von $\delta = 2\pi \times 125\text{ kHz}$ an.

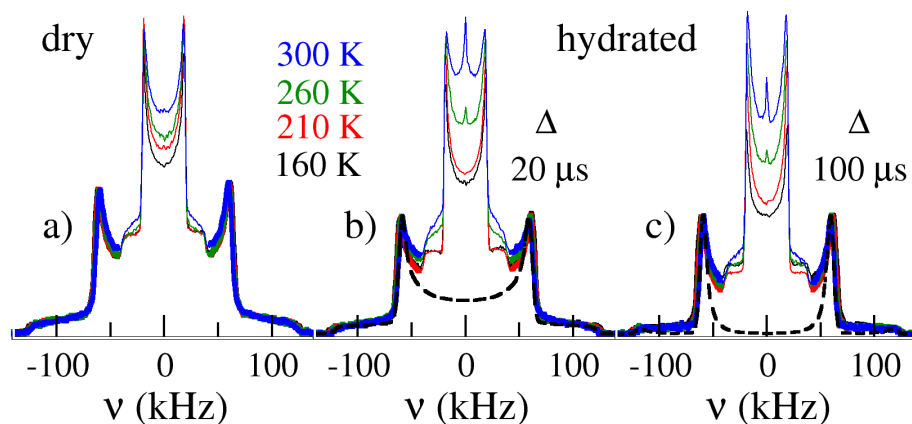


Abb. 6.1: Darstellung der ^2H -NMR-Spektren von CPC bei verschiedenen Temperaturen für a) die trockene Probe, b) und c) die mit $h = 0.3 \text{ g/g}$ hydratisierte Probe. a) und b) wurden mit einem Pulsabstand Δ von $20 \mu\text{s}$ aufgenommen, c) mit einem Pulsabstand von $100 \mu\text{s}$. Die Rückgratspektren sind mit stärkeren Linien gezeichnet. Die gestrichelten Linien in b) und c) sind mittels Random-Walk-Simulationen berechnete Spektren für einen 4° -Sprung auf einem Konusrand.

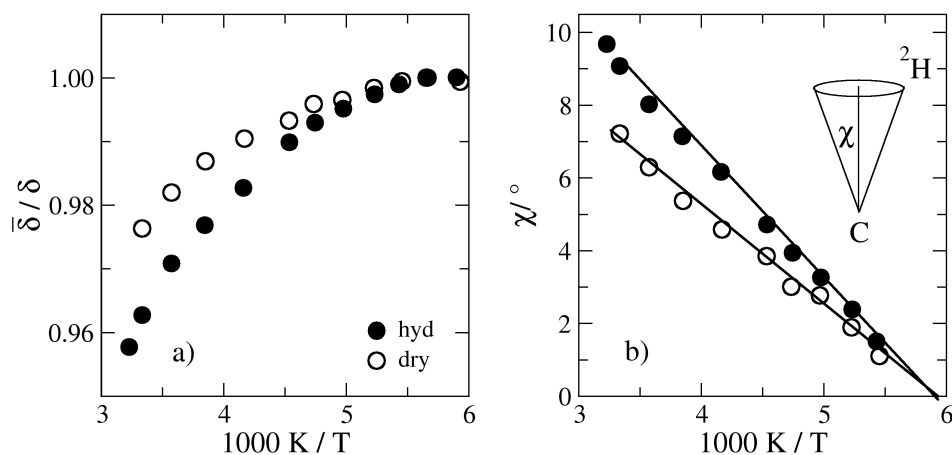


Abb. 6.2: a) Temperaturabhängigkeit der spektralen Breite der Spektren von trockenem und hydratisiertem CPC. Unter Annahme eines schnellen Zufallssprungs auf dem Rand eines Konus lässt sich daraus der in b) gezeigte Konusöffnungswinkel für beide Proben mittels Gleichung (3.52) berechnen.

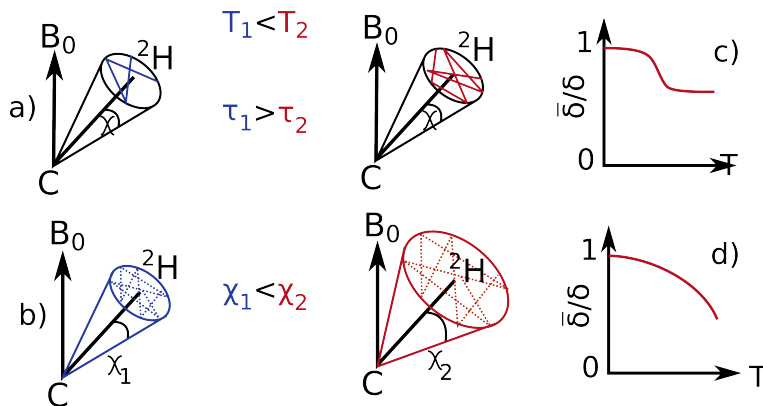


Abb. 6.3: Zwei Modelle für die Temperaturabhängigkeit einer kleinwinkligen Bewegung: a) die Bewegung auf dem Konus beschleunigt sich mit steigender Temperatur, der Konusöffnungswinkel bleibt gleich, b) die Amplitude der Bewegung erhöht sich mit der Temperatur, die Korrelationszeit bleibt gleich. Zusätzlich zu den Modellen ist schematisch die Temperaturabhängigkeit der spektralen Breite $\bar{\delta}/\delta$ gezeigt.

Diese Befunde zeigen dreierlei. (1) Das Proteinrückgrat führt auf Zeitskalen $\tau < \mu\text{s}$ Bewegungen aus. (2) diese werden vom Hydratationswasser beeinflusst und (3) diese Dynamik verschwindet mit Abkühlung bei $T \approx 180\text{ K}$.

Die geringe Verschmälerung der Spektren zeigt, dass die Bewegung der C-²H-Bindungen nur eine kleine Amplitude hat. Ein einfaches Modell für eine solche Bewegung ist der Zufallssprung der C-²H-Bindung auf einem Konus (engl. random jump on a cone (RJoC)). Der Konus ist definiert durch den halben Öffnungswinkel χ (vgl. Abb. 6.3). Grundsätzlich kann die Abnahme der spektralen Breite durch zwei Grenzfall-Szenarien verursacht werden:

- Die Korrelationszeit nimmt mit steigender Temperatur ab und die Geometrie/Amplitude der Bewegung bleibt unverändert (s. Abb. 6.3 (a)). Dieses Modell wird im Folgenden als Modell „Ratenänderung“ bezeichnet.
- Die Amplitude der Bewegung nimmt mit der Temperatur zu und die Korrelationszeit ist $\tau \ll 1/\delta$, so dass die Spektren immer im schnellen Grenzfall vorliegen (s. Abb. 6.3 (b)). Dieses Modell wird „Amplitudenänderung“ genannt.

Die beiden Grenzfälle lassen sich im Allgemeinen anhand der Temperaturabhängigkeit der spektralen Breite $\bar{\delta}/\delta$ unterscheiden. Für das Modell „Ratenänderung“ strebt die spektrale Breite sowohl im Hochtemperaturbereich, als auch im Tieftemperaturbereich gegen einen Plateauwert, wenn die Sprungkorrelationszeit τ das Zeitfenster der Spektrenmessung verlassen hat (vgl. Abb. 6.3(c)). Das Modell „Amplitudenänderung“ zeigt dagegen eine kontinuierliche Verschmälerung mit steigendem Konusöffnungswinkel χ , die Gleichung (3.52) folgt. Ein isotropes Spektrum wird bei einem Konusöffnungswinkel von 54.7° erhalten.

Ein Hochtemperaturplateau ist in den Messungen nicht zu sehen (vgl. Abb. 6.2). Daraus folgt jedoch nicht unmittelbar, dass das Modell „Ratenänderung“ ausgeschlossen werden kann. Es wäre theoretisch denkbar, dass die Aktivierungsenergie klein ist und die Versuchsfrequenz gering ist und die Korrelationszeit bei hohen Temperaturen das Zeitfenster der Spektren noch nicht verlassen hat¹.

Für tiefe Temperaturen wird der statische Plateauwert erreicht. Nach Modell „Ratenänderung“ müsste folglich die Korrelationszeit $\tau \gg 1\mu\text{s}$ sein. Wenn dies der Fall ist, findet die Dynamik bei tiefen Temperaturen im Zeitfenster des Stimulierten-Echo-Experiments statt und sie müsste mit dieser Technik messbar sein. Dies wird in Abschnitt 6.1.3 überprüft.

Im vermessenen Temperaturbereich lassen sich die beiden idealen Modelle nicht zweifelsfrei anhand der Temperaturabhängigkeit der spektralen Breite unterscheiden. Dennoch erscheint das Modell „Amplitudenänderung“ wahrscheinlicher.

Weitere Informationen lassen sich durch Messungen von Spektren unter Variation des Pulsabstands Δ gewinnen. Für größeren Pulsabstand Δ werden die Spektren sensibler auf kleinamplitudige Bewegungen (s. Kap. 3.2.3). Dies zeigt sich anhand der relativen zentralen Intensität R/H . $R/H(\Delta)$ nimmt stark ab, wenn die Korrelationszeit $\tau \approx 1/\delta \approx 1\mu\text{s}$ ist [273–275].

In den Spektren von CPC kann die relative zentrale Intensität des Rückgrats unglücklicherweise nicht direkt evaluiert werden, weil das Spektrum der Methylgruppen den zentralen Bereich überlagert. Um dennoch den erwarteten Verlauf der Spektren mit den Daten vergleichen zu können wurden Spektren mit $\Delta = 20\mu\text{s}$ und $\Delta = 100\mu\text{s}$ mit Random-Walk-Simulationen für einen RJoac mit $\chi = 4^\circ$ simuliert. Sie sind als gestrichelte Linien in Abb. 6.1 (b) und (c) eingezeichnet. Zu erkennen ist, dass die zentrale Intensität der simulierten Spektren mit Verlängerung des Pulsabstands abnimmt. Bei Verlängerung der Pulsabstände auf den Wert von $\Delta = 100\mu\text{s}$ lassen sich somit sehr kleinamplitudige Bewegungen auflösen.

Bei $|\nu| > 40\text{ kHz}$ können die simulierten Spektren nun mit den experimentellen Spektren verglichen werden, da bei diesen Frequenzen Beiträge der Methylgruppen vernachlässigt werden können. Die experimentellen Spektren mit $\Delta = 100\mu\text{s}$ verlieren

¹ Eine Abschätzung der Aktivierungsenergie und Korrelationszeiten ist in diesem Szenario wie folgt möglich: Die Änderung der spektralen Breite hat zwischen Einsetzen der Dynamik bei $T = 180\text{ K}$ und Ende des Messfensters bei $T = 300\text{ K}$ ihren Wendepunkt noch nicht erreicht, der Temperaturbereich des Übergangs ist folglich mindestens $\Delta T > 2 \cdot 125\text{ K}$ breit. Statische Spektren, bzw. Spektren des schnellen Grenzfalles, werden erhalten, wenn die Korrelationszeit mindestens 2 Größenordnungen größer bzw. kleiner $1/\delta$ ist. Im Temperaturbereich 180 K bis 425 K findet folglich maximal eine Änderung der Korrelationszeit von 4 Größenordnungen statt. Dies eingesetzt in die Arrheniusgleichung (Gl. (2.9)) führt zum oberen Grenzwert der Aktivierungsenergie von $E_a = 0.23\text{ eV}$. Hieraus kann wiederum unter Annahme einer Versuchsfrequenz von $\tau_0 = 10^{-12}\text{ s}$ mittels Gleichung (2.9) die Korrelationszeit bei Raumtemperatur zu $\tau(300\text{ K}) = 7 \cdot 10^{-9}\text{ s}$ abgeschätzt. Damit müsste bei Raumtemperatur bereits der verschmälerte Plateauwert erreicht sein und das Modell Ratenänderung kann bereits an dieser Stelle für sehr unwahrscheinlich erklärt werden.

bei keiner Temperatur so stark an Intensität wie die berechneten Spektren. Dies verdeutlicht, dass die Korrelationszeit bei keiner Temperatur den Wert $\tau \approx 1/\delta$ annimmt, was gegen das Modell „Ratenänderung“ spricht. Eine weitergehende Analyse der relativen zentralen Intensität R/H ist im Kapitel 6.2.1 zu finden.

Nehmen wir an, die Bewegung folgte dem Modell „Amplitudenänderung“. Dann lässt sich aus der spektralen Breite mittels Gleichung (3.52) die Amplitude der Bewegung berechnen. Sie ist in Abb. 6.2(b) als Funktion der Temperatur aufgetragen und zeigt, dass sich die spektrale Breite mit Bewegungen auf einem Konus mit $\chi < 10^\circ$ beschreiben lässt. Die Amplitude der Bewegung verschwindet bei tiefen Temperaturen.

Neben der Signatur kleinwinkliger Rückgratdynamik gibt es auch Zeichen für eine weitgehend isotrope Reorientierung oder zumindest Großwinkelsprünge. So zeigt sich in der Mitte des Spektrums ein Peak, der mit steigender Temperatur an Intensität zunimmt. Er hat eine Gesamtintensität von etwa 1 % im Spektrum und ist für $h = 0.0 \text{ g/g}$ abwesend. Die Hydratationsabhängigkeit der Spektren wird im Abschnitt 6.1.4 genauer untersucht. An dieser Stelle sei bereits darauf hingewiesen, dass dieser zentrale, schmale Peak darauf schließen lässt, dass ein kleiner Teil der Rückgratdeuteronen eine schnelle, weitgehend isotrope Bewegung ausführt, die vom Wasser beeinflusst wird.

Die Messung der Spektren und die Analyse der Temperaturabhängigkeit der Form der Spektren liefert Hinweise darauf, dass im Protein CPC bei Raumtemperatur eine kleinamplitudige Rückgratbewegung vorliegen könnte. Das Hydratationswasser verstärkt diese Bewegung und bei tiefen Temperaturen kommt sie auf der μs -Zeitskala zum Erliegen. Zwei Konusmodelle mit verschiedener Temperaturabhängigkeit - Ratenänderung und Amplitudenänderung - wurden als mögliche Grenzfälle eingeführt. Die Analyse der Spektren spricht für das Modell der Amplitudenänderung. Das Modell der Ratenänderung kann weitestgehend ausgeschlossen werden, es wird jedoch im Folgenden weiter auf seine Konsistenz mit den Ergebnissen der übrigen Messungen geprüft. Weiterer Aufschluss soll zunächst durch die Messung der Spin-Gitter-Relaxationszeit und später von Stimulierten-Echos gewonnen werden.

6.1.2 Messungen der Spin-Gitter-Relaxationszeit

Die Messungen des Magnetisierungsaufbaus wurden mit einer Saturation-Recovery-Pulsfolge (vgl. Kap. 3.2.2) durchgeführt. Die Spin-Gitter Relaxationszeit T_1 zeigt bei der vorliegenden Magnetfeldstärke von 7.1 T ein Minimum für die Zeitskala von $\tau \approx 1/\omega_L \approx 1 \text{ ns}$.

In Abbildung 6.4(a) sind die Magnetisierungsaufbaukurven exemplarisch für zwei Temperaturen gezeigt. Erneut werden die trockene Probe (offene Kreise) und die hydratisierte Probe (gefüllte Kreise) verglichen. Bei tiefen Temperaturen fallen die Relaxationskurven der beiden Proben zusammen, bei $T = 240 \text{ K}$ sind sie deutlich getrennt, was auf ein Einsetzen von „wassergekoppelter“ Dynamik mit Erwärmung hinweist.

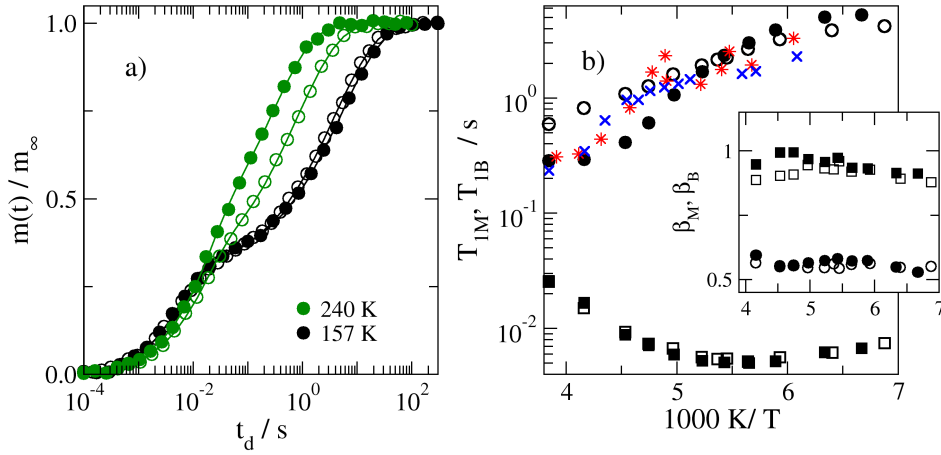


Abb. 6.4: a) Normierte Magnetisierungsaufbaukurven $m(t)/m_\infty$ der trockenen (offene Kreise) und der hydratisierten Probe (ausgefüllte Kreise) bei $T = 157\text{ K}$ und $T = 240\text{ K}$. Die durchgezogenen Linien sind Fits mit Gleichung (6.1). b) Relaxationszeiten aus dem Fit von Rückgrat T_{1B} (Kreise) und Methylgruppen T_{1M} (Quadrate). Zusätzlich sind die Relaxationszeiten für das Proteinerückgrat für Myoglobin (*, $h = 0.3\text{ g/g}$) und Elastin(x, $h = 0.43\text{ g/g}$) aus [175, 270] eingetragen. Im Inset sind die Streckungsparameter β_M und β_B aufgetragen.

Für tiefe Temperaturen (hier $T = 157\text{ K}$) wird ein zweistufiger Magnetisierungsaufbau beobachtet. Die erste Stufe wird durch die Relaxation der Methylgruppen (Index M) verursacht, die zweite Stufe spiegelt die Relaxation der Rückgratdeuteronen (Index B) wider, wie eine spektral aufgelöste Analyse belegt [147]. Bei hohen Temperaturen nähern die Relaxationszeiten der beiden Deuteronenspezies einander an und für $T > 240\text{ K}$ lassen sich die beiden Stufen nicht mehr eindeutig trennen.

Die Messungen $T < 260\text{ K}$ wurden mit einem zweistufigen Fit angepasst. Sowohl für die Methylgruppen als auch die Rückgratdeuteronen wurde ein gestreckt exponentieller Magnetisierungsaufbau angenommen:

$$m(t)/m_\infty = 1 - \left((1 - a_B) \exp \left[-(t/T_{1M})^{\beta_M} \right] + a_B \exp \left[-(t/T_{1B})^{\beta_B} \right] \right). \quad (6.1)$$

Die Amplitude a_B ist proportional zum Anteil der Rückgratdeuteronen in der Probe und liegt je nach Austauschgrad während der Probenpräparation zwischen 57% und 70% (vgl. Kap. 4.2.2). Bei Fitten wurde dieser Parameter frei gelassen. Fits mit dieser Gleichung sind in Abbildung 6.4(a) als durchgezogene Linien eingezeichnet und zeigen sehr gute Übereinstimmung mit den Daten.

Aus den Fits werden Relaxationszeiten T_{1M} und T_{1B} für beide Komponenten extrahiert und als Funktion der Temperatur in Abbildung 6.4(b) aufgetragen. Die Relaxationszeiten der Methylgruppen sind unabhängig vom Hydratationsgrad und weisen ein Minimum bei ca. $T \approx 180\text{ K}$ auf. Dieses Minimum zeigt an, dass die Korrelationszeit der Methylgruppen den Wert $\tau \approx 1\text{ ns}$ annimmt.

Die T_1 -Zeiten der Rückgratdeuteronen fallen zu hohen Temperaturen hin kontinuierlich ab und durchlaufen kein Minimum. Folglich kann keine Temperatur bestimmt werden, bei der $\tau \approx 1$ ns gilt. Eine Messung bei höheren Temperaturen ist nicht möglich, da Proteine bei höheren Temperaturen denaturieren können (vgl. Kap. 4).

Vergleichen wir die T_1 -Zeiten der beiden Proben in Abbildung 6.4(b). In den Methylgruppen ist, wie erwartet [221], kein Unterschied erkennbar. Dagegen zeigen die Rückgratdeuteronen in der hydratisierten Probe bei hohen Temperaturen kleinere T_1 -Werte als in der trockenen Probe. Die Dynamik in der hydratisierten Probe ist demnach relaxationswirksamer, da entweder τ beschleunigt wird, oder die Amplitude größer wird. Der Unterschied zwischen den Proben nimmt zu tiefen Temperaturen ab und verschwindet bei $T \approx 180$ K. Diese Beobachtung bestätigt die Aussagen aus der Untersuchung der Linienform: Bei $T \approx 180$ K setzt ein relaxationswirksamer Bewegungsprozess des Rückgrats ein, der durch Wassers erleichtert wird.

Zusätzlich zu den Daten des CPCs sind in Abbildung 6.4(a) die Ergebnisse der Messungen an hydratisierten Elastin und Myoglobin eingezeichnet [175, 270]. Da es sich bei diesen Proteinen nicht um deuterierte Proteine handelt, stammt das Signal von austauschbare Deuteronen, die sich hauptsächlich in den Amidgruppen befinden (vgl. Fußnote 3 in Kap. 4). Die Temperaturabhängigkeit der Spin-Gitter-Relaxation ist für die drei verschiedenen Proteine ähnlich. Die beobachtete Rückgratbewegung hängt demnach kaum von der Art des Proteins ab. In Kapitel 6.2.2 werden die Vorhersagen der beiden Modelle für den Verlauf der T_1 -Zeiten diskutiert.

Weiterer Einblick lässt sich aus dem Streckungsparameter β gewinnen. Dieser gibt an, ob die Relaxation der jeweiligen Komponente exponentiell verläuft oder nicht. Er ist für beide Komponenten im Inset von Abbildung 6.4(b) zu sehen. Die Methylgruppenprotonen zeigen ein nahezu exponentielles Verhalten ($\beta \approx 1$), während die Rückgratprotonen ein stark nicht-exponentielles ($\beta < 1$) Verhalten aufweisen. Ein gestreckt exponentieller Magnetisierungsaufbau mit $\beta < 1$ ergibt sich, wenn eine Verteilung von Relaxationszeiten T_1 vorliegt. Eine solche Verteilung kann zum einen durch eine Verteilung von Korrelationszeiten aber auch durch eine Verteilung von Bewegungsgeometrien verursacht werden. Bei der Berechnung der Spin-Gitter-Relaxationszeiten für verschiedene Bewegungsmodelle in Kapitel 6.2.1 wird auf diese Information zurückgegriffen.

Die Ergebnisse der Relaxationszeitmessungen bestätigen die Ergebnisse der Spektrenauswertung. Es wird ein Bewegungsprozess gefunden, der bei ca. 180 K einsetzt und der durch Wasser erleichtert wird. Darüber hinaus lässt sich zum einen erkennen, dass die Korrelationszeit der Rückgratbewegung im untersuchten Temperaturintervall nicht den Wert von $\tau \approx 1$ ns unterschreitet und zum anderen, dass der Bewegungsprozess des Rückgrats eine Verteilung von Geometrien und oder Zeitkonstanten aufweist. Mit Hilfe von Stimulierten-Echo-Experimenten wird nun untersucht, ob sich die Dynamik bei tiefen Temperaturen verlangsamt und in das Zeitfenster von ms bis s kommt.

6.1.3 Stimulierte-Echo-Experimente

In der Auswertung der Spektren wird beobachtet, dass die spektrale Breite mit Abkühlung bei $T \approx 180\text{ K}$ ihren statischen Wert annimmt. Diese Beobachtung wurde in den Modellen „Ratenänderung“ und „Amplitudenänderung“ auf unterschiedliche Weise erklärt. Das zweite Modell besagt, dass die Amplitude der Bewegung bei dieser Temperatur verschwindet. Das Modell „Ratenänderung“ nimmt dagegen an, dass die Korrelationszeit der Bewegung so langsam wird, dass sie auf der Zeitskala der Spektren statisch wirkt. Mit Hilfe von Stimulierten-Echo-Experimenten ist es nun möglich bei tiefen Temperaturen eindeutig zwischen diesen Grenzfällen zu unterscheiden.

Die STE-Signale der trockenen und hydratisierten Probe wurden bei zwei verschiedenen Temperaturen gemessen: bei 180 K (s. Abb. 6.5(a)) und bei 240 K (s. Abb. 6.5(b)). Die Evolutionszeit t_p betrug jeweils $30\mu\text{s}$. Diese Evolutionszeit ist nach [269] geeignet, um Kleinwinkeldynamik aufzulösen.

In beiden Proben ist ein zweistufiger Abfall des Signals zu sehen. Erneut lässt sich der Abfall bei kürzeren Zeiten den Methylgruppen zurechnen und der Abfall bei größeren Zeiten dem Rückgrat attribuieren, wie spektral aufgelöste Untersuchungen zeigen (s. u.). Wieder zeigt der Vergleich der Proben fast keinen Unterschied bei tiefer Temperatur und einen schnelleren Abfall der hydratisierten Probe bei höherer Temperatur.

Ein Abfall des STE-Signals erfolgt, wenn die Dynamik zu einem Verlust der Orientierungskorrelation führt. Überlagert wird der Abfall durch Dynamik jedoch durch den Abfall der Magnetisierung durch die Spin-Gitter-Relaxation. Gemeinsam mit den Daten aus den STE-Experimenten sind daher die Magnetisierungsaufbaukurven aus den T_1 -Messungen der hydratisierten Probe als $1 - M(t)$ (gestrichelte Linien) aufgetragen.

Die Spin-Gitter-Relaxationsfunktion liegen nahe der STE-Kurven, dennoch ist ein Unterschied erkennbar. Dieser Unterschied kann nun nicht direkt mit einem Korrelationsabfall in der Probe erklärt werden, denn die Experimente führen zu unterschiedlichen Stufenhöhen der Methyl- bzw. Rückgratbeiträge. Im Saturation-Recovery-Experiment ergibt sich die Stufenhöhe $a_{M,B}$ aus der Anzahl der Deuteronen in der jeweiligen Komponente. Die Anteile betragen: $N_{\text{Methyl}} : N_{\text{Rückgrat}} = 43 : 57$ (vgl. Kap. 4.2.2). Im STE-Experiment ist der Zusammenhang komplizierter. Hier hängt die Stufenhöhe zusätzlich vom Produkt aus der Evolutionszeit und der spektralen Breite $\bar{\delta}t_p$ ab [27, 268]. Weiterhin wirken sich Einflüsse der Spin-Spin-Relaxation auf die Amplituden der beiden Signalkomponenten in den Experimenten unterschiedlich aus. Somit ist eine Abweichung der Stufenhöhen des STE-Signal im Vergleich zum Saturation-Recovery-Experiment zu erwarten.

Um den Beitrag der Rückgratspektren selektiv zu ermitteln, wurde wie folgt vorgegangen. Aus den Zeitsignalen des STE-Experiments wurden „STE-Spektren“ berechnet. Nun wurde über die Signalintensität der Rückgratdeuteronen im Bereich $|\nu| \geq 40\text{ kHz}$

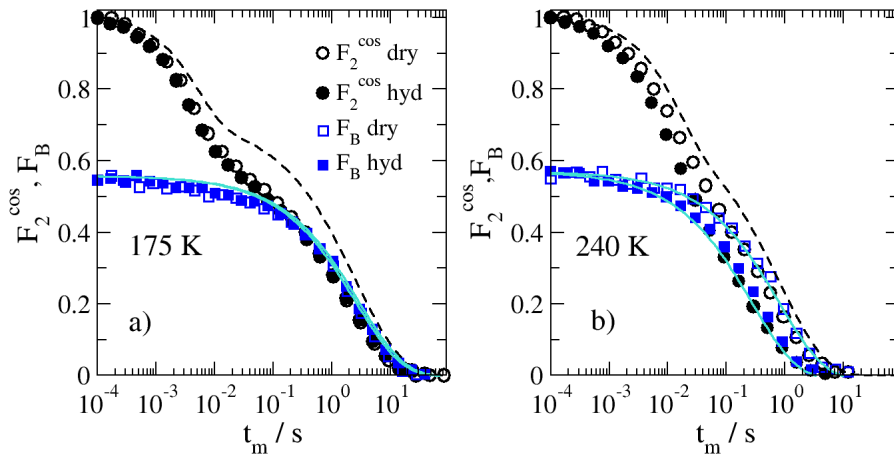


Abb. 6.5: Stimulierte-Echo-Signale der gesamten Probe F_2^{\cos} und des Proteinrückgrats F_B für die trockene (offene Kreise) und die hydratisierte Probe (ausgefüllte Kreise) von Experimenten mit $t_p = 30 \mu\text{s}$ bei $T = 180 \text{ K}$ und $T = 240 \text{ K}$. Die Signalintensität der Rückgratdeuteronen F_B (blaue Symbole) wird durch Integration über Stimulierte-Echo-Spektren im Bereich $|\nu| > 40 \text{ kHz}$ gewonnen. Die zugehörigen Spin-Gitter-Relaxationskurven $\Phi(t_m)$ und $\Phi_B(t_m)$ sind als gestrichelte Linie bzw. hellblau durchgezogene Linie eingezeichnet.

integriert. Die dadurch erhaltenen STE-Signale sind als blaue Symbole in Abbildung 6.5 gezeigt.

Die durchgezogenen Linien ergeben sich aus den T_1 -Kurven, der Rückgratanteil wurde dafür auf die - aus den Stimulierten-Echo-Spektren - gewonnene Amplitude skaliert. Die so erhaltenen Daten aus Saturation-Recovery-Messungen und Stimuliertem-Echo stimmen sehr gut überein. Dies zeigt, dass der Abfall der Magnetisierung in dem STE-Experiment allein durch den T_1 -Zerfall der Magnetisierung verursacht wird.

Die Übereinstimmung kann ebenfalls anhand eines Vergleichs von T_{1B} mit den Abfallzeiten τ_{STE} der Stimulierten-Echo-Signale bestätigt werden, in denen über den gesamten Temperaturbereich eine gute Übereinstimmung erhalten wird (s. Abb. 6.4 in [147]).

Bei der höheren Temperatur $T = 240 \text{ K}$ beträgt die Amplitude der Konusbewegung nach Abb. 6.2(b) mindestens 7° . Abbildung 3.7 zeigt, dass diese Amplitude ausreichend ist, um in Stimulierten-Echo-Experimenten sichtbar zu sein. Dennoch ist auch bei dieser Temperatur nur der T_1 -Abfall zu sehen. Folglich muss die Dynamik außerhalb des Zeitfensters der STE Methode stattfinden, die Korrelationszeit ist $\tau < 1 \mu\text{s}$.

Kehren wir zur Ausgangsfrage zurück: Wird die Dynamik bei 180 K zu langsam, oder verschwindet die Amplitude? Die Stimulierten-Echo-Experimente zeigen keinen Signalabfall bei $T = 180 \text{ K}$. Bei dieser Temperatur wurde der statische Grenzfall erreicht. Wäre die Dynamik in diesem Fall zu langsam (Modell Ratenänderung), so müsste ein

STE-Signal-Abfall aufgrund von Dynamik zu sehen sein. Dies ist nicht der Fall, es ist demnach die Amplitude der Bewegung, die mit sinkender Temperatur verringert und bei 180 K gegen Null strebt, so dass sie in den STE-Messungen nicht sichtbar ist.

6.1.4 Einfluss des Hydratationsgrades auf die Proteindynamik

Um den Einfluss des Hydratationsgrades auf die Rückgratdynamik des Proteins CPC genauer zu untersuchen wurden Messungen für weitere Hydratationsgrade durchgeführt. Insgesamt wurden vier Proben mit Hydratationsgraden von $h = 0.0, 0.3, 0.5$ und 1.0 g/g vermessen.

In Abbildung 6.6 sind die Spektren bei allen vier Hydratationsgraden für (a) $T \approx 240$ K² und b) $T = 300$ K abgebildet. Bei der höheren Temperatur ist ein zentraler Peak zu sehen, der mit steigendem Hydratationsgrad an Intensität gewinnt. Die Linie zeigt einen weitgehend isotropen Prozess mit einer Korrelationszeit von $\tau \ll 1/\delta$ an. Bei $h = 1.0$ g/g nimmt er weniger als 5% der Gesamtintensität ein.

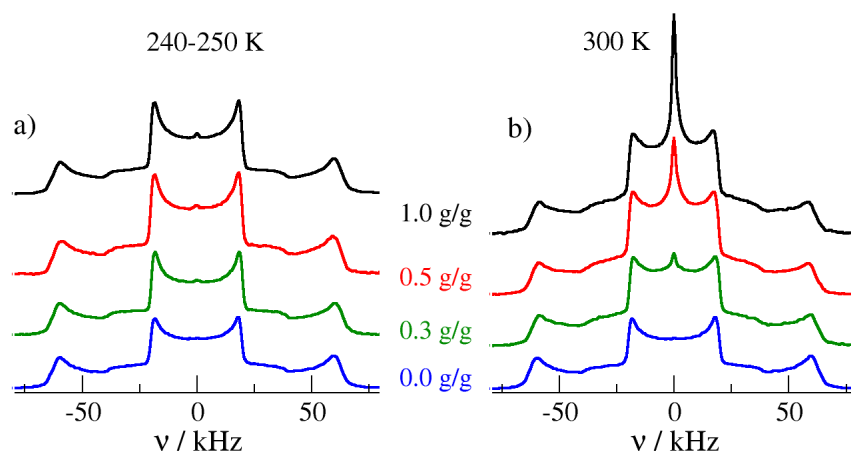


Abb. 6.6: ²H-NMR-Spektren für a) $T = 250$ K für $h = 1.0$ g/g und $T = 240$ K für alle anderen Hydratationsgrade sowie b) für $T = 300$ K bei den bezeichneten Hydratationsgraden. Der Pulsabstand Δ beträgt $20 \mu\text{s}$.

Die erste Frage, die sich nun stellt ist, welche Deuteronengruppe dieses Signal verursacht. Sind die Methylgruppen beteiligt, das Proteinerückgrat, oder ist es womöglich ein Teil des Wassers, das trotz sorgfältiger Präparation durch Deuteronenaustausch sichtbar wird?

Die Methylgruppendiffusionsdynamik ist vom Hydratationsgrad unabhängig, wie in den T_1 -Zeiten in Abb. 6.4 (b) und in der Literatur gezeigt wurde [197, 221]. Die Methylgruppenrotation ist demnach nicht für den Peak verantwortlich. Der Beitrag des Wassers

² Das Spektrum mit $h = 1.0$ g/g wurden bei 250 K aufgenommen

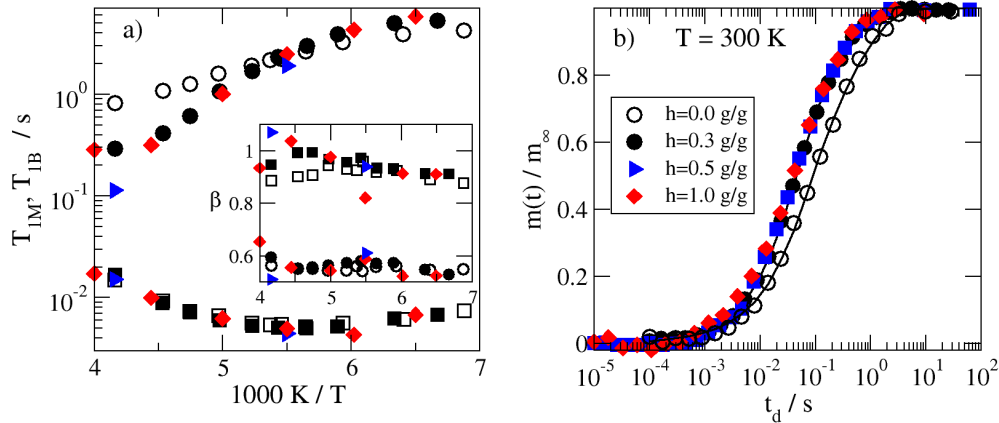


Abb. 6.7: a) Temperaturabhängigkeit der Relaxationszeiten für das Proteinerückgrat und die Methylgruppen aus dem Fit der Magnetisierungsaufbaukurven mit Gleichung (6.1) bei verschiedenen Hydratationsgraden. Im Inset sind die Streckungsparameter eingezeichnet. b) Magnetisierungsaufbaukurven bei $T = 300$ K.

wird ausgeschlossen, da der Austausch nicht mit dem Anteil des Wassers skaliert, wie in Abb. 5.11 in [147] gezeigt. Folglich wird der zentrale Peak dem Proteinerückgrat zugeordnet.

Ein kleiner Teil des Rückgrats führt also in Anwesenheit von Wasser isotrope Reorientierungen aus. Voraussetzung für diesen Bewegungsprozess ist, dass der Hydratationsgrad hinreichend groß ist und somit dass Bulkwasser, also Wasser das nicht über Wasserstoffbrückenbindungen in Kontakt mit dem Protein steht, vorliegt. Dies zeigt sich auch darin, dass für tiefe Temperaturen $T < 270$ K und im trockenen Spektrum der Peak sehr schwach und vom Hydratationsgrad unabhängig ist. Das Bulkwasser ist bei diesen tiefen Temperaturen gefroren ist und kann nicht auf die Bewegung des Proteins einwirken. Eine Erhöhung des Hydratationsgrades jenseits von $h = 0.3$ g/g hat bei diesen Temperaturen wegen des erwähnten Gefrierens von Wasser keinen weiteren Einfluss.

Eine bei tiefen Temperaturen vom Hydratationsgrad $h > 0.3$ g/g unabhängige Dynamik zeigen auch die Messungen der Spin-Gitter-Relaxationszeit. Die T_1 -Zeiten sind in 6.7(a) für alle Hydratationsgrade gezeigt. Zwischen der trockenen Probe und den hydratisierten Proben ist ein Unterschied erkennbar, die Proben mit höherer Magnetisierung stimmen in den Relaxationszeiten mit der Probe bei $h = 0.3$ g/g fast vollständig überein. Der relaxationswirksame dynamische Prozess wird vom Oberflächenwasser verstärkt. Erst bei hohen Temperaturen $T > 270$ K kann sich ein möglicher Einfluss des als Bulk vorliegenden Wassers zeigen. In Abbildung 6.7(b) sind die Magnetisierungsaufbaukurven für alle Hydratationsgrade gezeigt. Alle Hydratationsgrade $h \geq 0.3$ g/g haben denselben Verlauf, der schneller ist als in der trockenen Probe. Bei der Probe mit dem höchsten Hydratationsgrad wird ein leicht beschleunigter Magnetisierungsaufbau am Fuß der Magnetisierungskurve beobachtet. Die Abweichung ist gering und könnte

mit dem in den Spektren beobachteten zentralen Peak in Zusammenhang stehen. Um dies zu klären, können in Zukunft teilrelaxierte Spektren durchgeführt werden. Ein darüber hinausgehender Einfluss des Bulkwassers wird nicht festgestellt.

Die Untersuchung der Dynamik in Abhängigkeit der Hydratisierung führt zu zwei Ergebnissen bestätigt, dass die kleinamplitudige Bewegung durch das Hydrationswasser verstärkt wird. Darüber hinaus wird ein weiterer weitgehend isotroper Prozess des Proteinrückgrates gefunden, der nur von einem kleinen Teil der Proteindeuteronen ausgeführt wird und der vom Bulkwasser abhängt.

6.2 Konusmodelle

Mit Hilfe der ^2H -NMR-Experimenten wird gefunden, dass die Rückgratdynamik eine kleinwinklige Bewegung ist, deren Amplitude sich mit steigender Temperatur vergrößert. Die Messungen der Spin-Gitter-Relaxationszeit zeigen, dass eine Verteilung von entweder Korrelationszeiten oder Amplituden vorliegt.

Kleinamplitudige Bewegungen lassen sich mit Konusmodellen beschreiben. In diesem Kapitel sollen diese Modelle zur Berechnung von NMR-Spektren und der Berechnung der Spin-Gitter-Relaxationszeit eingesetzt werden. Auf diesem Weg wird untersucht, welche Art der Verteilung der Bewegung zu Grunde liegt.

Die NMR-Spektren werden mit Hilfe von Random Walk-Simulationen in Kapitel 6.2.1 berechnet. Mit dem Formalismus von Lipari und Szabo werden in Kapitel 6.2.2 die Spin-Gitter-Relaxationszeiten für verschiedene Szenarien ermittelt.

6.2.1 Berechnung von Spektren mit Random-Walk-Simulationen

Die Art der Linienformänderung von NMR-Spektren ist charakteristisch für die detektierte Bewegung. Mit Random-Walk-Simulationen (RWS) können NMR-Spektren ausgehend von verschiedenen Bewegungsmodellen simuliert werden. Das Funktionsprinzip von Random-Walk-Simulationen zur Simulation von ^2H -NMR-Spektren wurde in Abschnitt 3.2.5 erläutert.

In allen Simulationen wird das Konusmodell eines Zufallssprung auf einem Konusrand (RJoAC) verwendet. Dieses ist in Abb. 6.3 vorgestellt. Nun werden verschiedene Temperaturabhängigkeiten angenommen. Den Startpunkt stellen die beiden Szenarien „Ratenänderung“ und „Amplitudenänderung“ dar. Ausgehend davon werden im zweiten Abschnitt Modelle mit einer Verteilung von Winkeln und Sprungzeiten verwendet und überprüft, ob sie mit den experimentellen Daten übereinstimmen. Zum Vergleich werden immer die Daten der Probe CPC mit einem Hydrationsgrad von $h = 0.3 \text{ g/g}$ herangezogen. Verglichen werden die Parameter relative zentrale Intensität R/H und die spektrale Breite $\overline{\delta}/\delta$.

Modelle ohne Verteilungen von Sprungzeiten oder Winkeln

Die relative Intensität im Zentrum des Spektrums (R/H) ist sensitiv auf die Geometrie der Bewegung [172, 269, 272]. Charakteristisch ist insbesondere, wie sich R/H als Funktion des Pulsabstands Δ ändert. Die Spektren wurden bei vier Pulsabständen $\Delta = 20, 50, 100, 200 \mu\text{s}$ gemessen und die relative Intensität des Spektrums bei $|\nu| = 40 \text{ kHz}$ bestimmt (R/H_{40}). Die Wahl der Frequenz außerhalb der Spektrenmitte ist notwendig, weil die zentrale Intensität durch Methylgruppenspektrum überlagert ist. Über den Parameter R/H_{40} hinaus muss ein Modell auch die spektrale Breite $\bar{\delta}/\delta$ nachbilden können. Sie wurde jeweils für einen Pulsabstand von $\Delta = 20 \mu\text{s}$ ausgewertet.

Die experimentell aus den Spektren gewonnenen Werte für die spektrale Breite $\bar{\delta}/\delta$ und für R/H_{40} sind für die vier gemessenen Pulsabstände Δ in Abhängigkeit von der Temperatur in Abbildung 6.8(a) gezeigt. Der temperaturabhängige Verlauf ist durch vier Eigenschaften gekennzeichnet:

- Alle R/H_{40} -Kurven weisen ein Minimum auf.
- Dieses Minimum ist schwach ausgeprägt.
- Für tiefe Temperaturen nähern sich die vier Kurven an.
- Für hohe Temperaturen laufen die vier Kurven auseinander.

Die experimentellen Daten werden nun mit den simulierten Daten für die Modelle „Ratenänderung“ und „Amplitudenänderung“ verglichen. Die verwendeten Modellparameter sind in Tabelle 6.1 angegeben.

Tab. 6.1.: Parameter der verschiedenen Modelle

Modellname	Winkel	$\tau_j / \mu\text{s}$	Winkelverteilung
Ratenänderung	$\chi = 10^\circ$	$10^{-2}-10^3$	-
Amplitudenänderung	$\chi = 0^\circ - 10^\circ$	10	-
Exp. Winkelverteilung	$\Gamma_0 = 0^\circ - 10^\circ$	0.3	s. Gl. (6.2)

Für das Modell „Ratenänderung“ (s. Abb. 6.8(b)) zeigt R/H_{40} ein tiefes Minimum. Die Kurven laufen sowohl für tiefe als auch für hohe Temperaturen (respektive kleine und große Sprungkorrelationszeiten) zusammen. Somit sind nur zwei der oben genannten Kriterien erfüllt. Die spektrale Breite ändert sich in einem kleinen Zeitintervall zwischen zwei Plateauwerten und weicht deutlich vom experimentellen $\bar{\delta}/\delta$ ab.

Für das Modell „Amplitudenänderung“ (s. Abb. 6.8(c)) sinkt R/H_{40} bereits bei kleinen Winkeln stark ab. Darüber hinaus wird auch keine Divergenz bei größeren Amplituden gefunden, folglich stimmt das Modell nicht mit den experimentellen Werten überein. Die spektrale Breite hingegen wird gut nachgebildet.

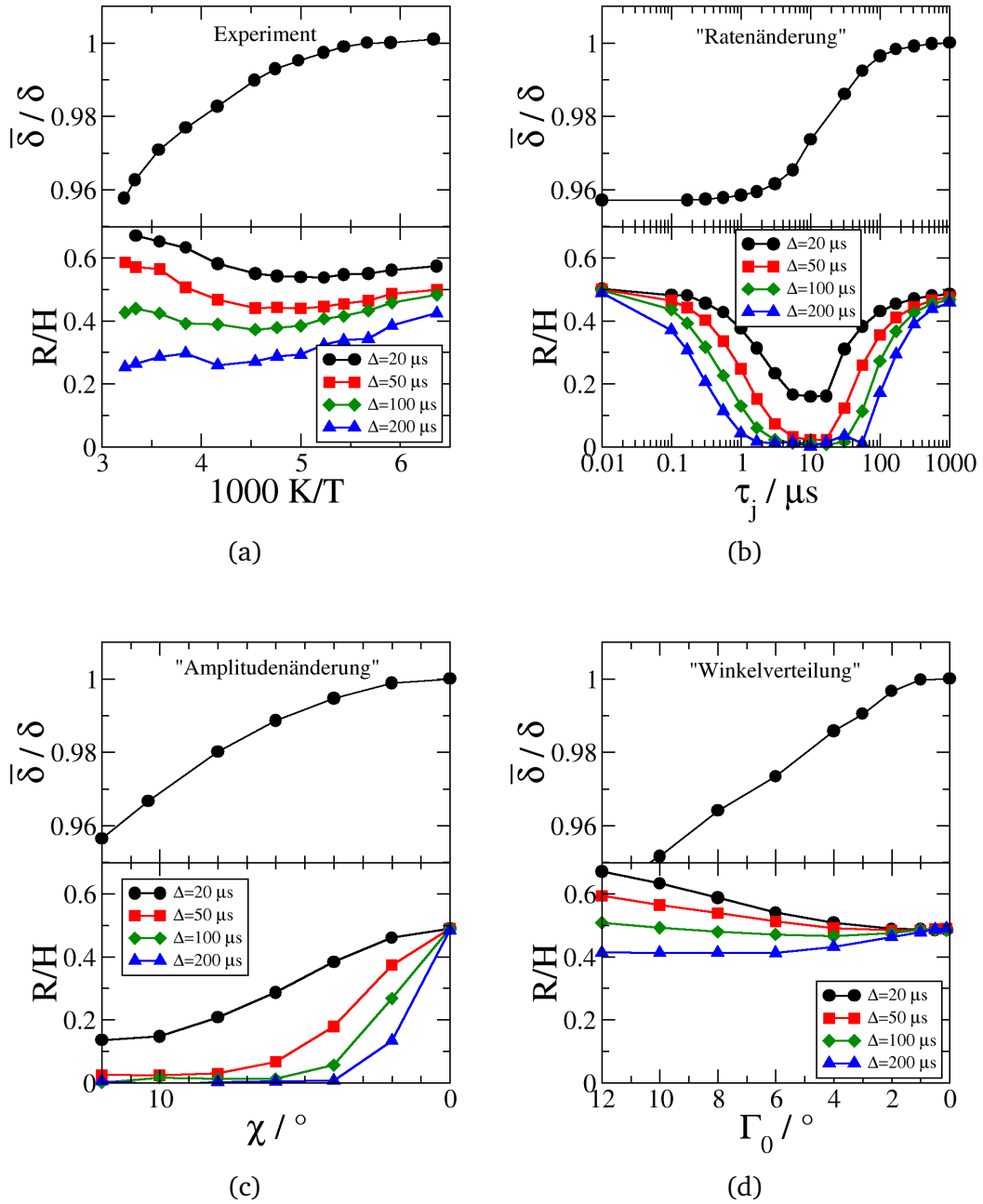


Abb. 6.8: Spektrale Breite (oberes Bild) bei $\Delta = 20 \mu\text{s}$ und relative zentrale Intensität (unteres Bild) bei $\nu = 40 \text{ kHz}$ für die Pulsabstände $\Delta = 20, 50, 100, 200 \mu\text{s}$ a) experimentelle Daten aus den NMR-Spektren der Probe $h = 0.3 \text{ g/g}$, b) Modell „Ratenänderung“ (vgl. Abb. 6.3(a)), c) Modell „Amplitudenänderung“ (vgl. Abb. 6.3(b)), d) Modell „Winkelverteilung“ (s. Text).

Die beiden einfachen Modelle können somit nicht beide Linienformparameter reproduzieren. Die Rückgratdynamik im CPC ist offenbar komplizierter. Der niedrige Streckungsparameter $\beta_B < 1$ (vgl. Abb. 6.4) weist auf eine Verteilung von Korrelationszeiten oder Amplituden hin. Beide Ansätze werden verfolgt.

Modelle mit Verteilungen von Sprungzeiten oder Winkeln

In diesem Abschnitt werden die Simulationsergebnisse von Modellen mit Verteilungen von Sprungzeiten oder Winkeln vorgestellt. Zunächst wurde eine logarithmische Gauß-Verteilung von Sprungkorrelationszeiten für beide Modelle eingeführt. Dies ist im Anhang für verschiedene Werte von σ gezeigt (vgl. Abb. A.2). Dann wurde die in der Literatur [5, 118] vorgeschlagenen Gaußschen Winkelverteilung simuliert (s. Abb. A.3). Eine gute Beschreibung der experimentellen Ergebnissen lässt sich mit diesen beiden Modellen nicht erhalten.

Da die genannten Ansätze nicht erfolgreich waren, wurden zur weiteren Verfeinerung der Bewegungsmodelle Erkenntnisse aus MD-Simulationen von Elastin herangezogen. In Abb. 5.13 ist die Winkelverteilung der N-H Bindungen von Elastin gezeigt. Die Winkelverteilung lässt sich über einen großen Winkelbereich mit einer Exponentialfunktion $P(\chi) \propto \exp(-\frac{\chi}{\Gamma_0})$ beschreiben. Bei kleinen Winkeln hat sie ein Maximum. Diese Funktion wurde in einer ersten Näherung durch eine exponentielle Winkelverteilung modelliert, die bei kleinen Winkeln abgeschnitten ist:

$$P(\chi) = \begin{cases} 0, \chi < C \\ \frac{1}{N} \exp\left(-\frac{\chi}{\Gamma_0}\right), \chi > C \end{cases} \quad \text{mit } N = \frac{\exp\left(\frac{\chi_{\max}}{\Gamma_0(T)}\right)}{\exp\left(\frac{(\chi_{\max}-C)}{\Gamma_0(T)} - 1\right) \frac{1}{\Gamma_0(T)}} \quad (6.2)$$

mit der Normierungskonstanten N , worin χ_{\max} für den maximalen Winkel von 90° steht und der Cutoff als $C = 0.3\Gamma_0$ angenommen wurde. Diese Verteilung wird im folgenden als Modell „Winkelverteilung“, bezeichnet.

Die mit dieser Verteilung simulierten Spektren in Abb. 6.8(d) zeigen ein $R/H_{40}(T)$ Muster, das die vier oben genannten Kriterien erfüllt und den experimentellen Daten nahe kommt. Die spektrale Breite fällt auf einen Wert von 0.95 ab, die exakte Form des Abfalls ist allerdings von den experimentellen Daten verschieden.

Für das Modell der exponentiellen Winkelverteilung mit Cutoff soll nun exemplarisch die Umrechnung von Winkelskala auf Temperaturskala gezeigt werden. Dieser Schritt ermöglicht es, die Temperaturabhängigkeit der spektralen Breite mit dem Modell einer Winkelverteilung zu reproduzieren.

Zur Umrechnung werden zwei Schritte benötigt. Diese sind in Abb. 6.9(a) und (b) veranschaulicht. Zunächst wird $\bar{\delta}/\delta$ näherungsweise durch eine lineare Funktion (rote Linie in Abb. 6.9(a)) des charakteristischen Winkels Γ_0 beschrieben: $\bar{\delta}/\delta(\Gamma_0) = m\Gamma_0 + b$.

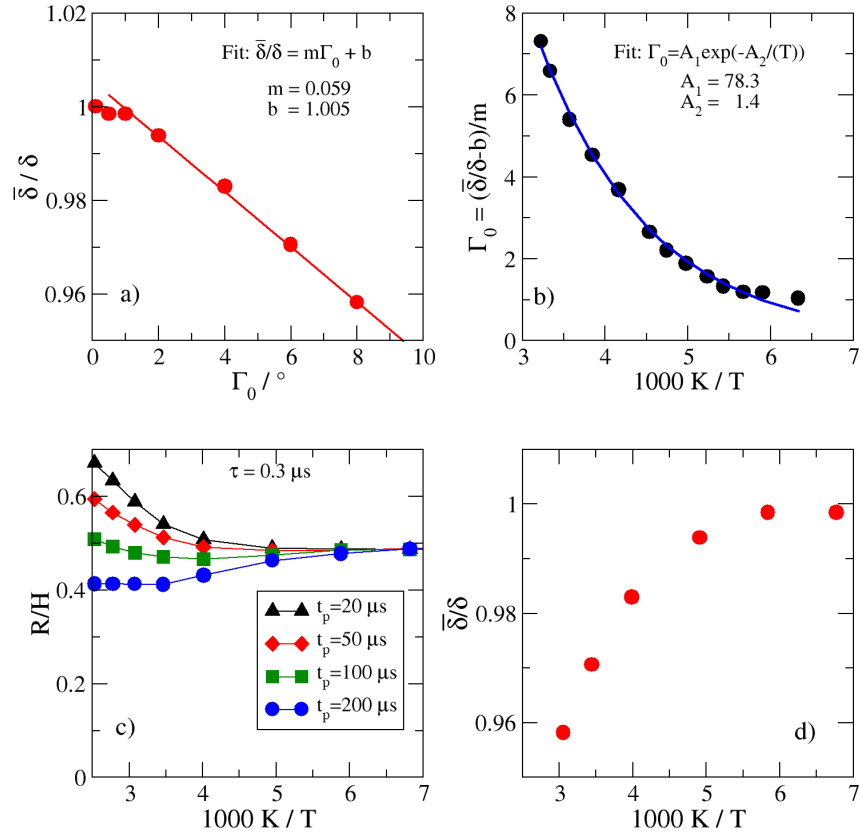


Abb. 6.9: Umrechnung des charakteristischen Winkels Γ_0 des Bewegungsmodells mit exponentieller Winkelverteilung in eine Temperaturskala. a) zeigt die Parametrisierung des Zusammenhangs zwischen $\bar{\delta}/\delta$ und Γ_0 und b) die Anpassung von Γ_0 als Funktion der inversen Temperatur ($1000/T$). Nach Umrechnung der Winkelskala in eine Temperaturskala: c) relative zentrale Intensität und d) spektrale Breite als Funktion der Temperatur.

Diese Funktion wird nun genutzt, um die spektrale Breite der experimentellen Daten (schwarze Punkte) in charakteristische Winkel umzurechnen (s. Abb. 6.9(b)). Daraus ergibt sich die in Abb. 6.9(b) dargestellte Kurve. Um nun die Temperaturwerte für die berechneten Γ_0 zu interpolieren, wird nach einer Funktion $\Gamma_0(T)$ gesucht. Der Form nach lässt sich $\Gamma_0(T)$ in Abb. 6.9(b) gut mit einer exponentiellen Funktion $\Gamma_0 = A_1 \exp(-A_2/T)$ fiten. Der Fit ist als blaue durchgezogene Linie in der Abbildung eingetragen.

Anschließend wird diese Funktion $\Gamma_0(T)$ dazu genutzt, die Größen R/H_{40} und $\bar{\delta}/\delta$ der exponentiellen Winkelverteilung in Abb. 6.8(d) als Funktion der Temperatur darzustellen. Das Ergebnis ist in den Abbildungen 6.9(c) und (d) gezeigt. Der Vergleich der Abbildung 6.9(c) mit der Darstellung von R/H_{40} als Funktion des charakteristischen Winkels in Abbildung 6.8(d) zeigt: Durch die Umrechnung der x-Achse von charakteristischem Γ_0 in Temperatur verändert sich die Form des Temperaturverlaufs der

relativen zentralen Intensität. Die Kurven erfüllen weiterhin die oben genannten Kriterien, eine bessere quantitative Übereinstimmung mit den experimentellen Werte in 6.8(a) wird nicht erreicht.

Durch Umrechnung des charakteristischen Winkels in eine Temperaturabhängigkeit, ist das Modell der exponentiellen Winkelverteilung nun endgültig fixiert. Diese Festlegung wird bei der Berechnung der Relaxationszeiten im folgenden Kapitel weiterverwendet.

In diesem Abschnitt wurden die die Linienformparameter R/H_{40} und $\bar{\delta}/\delta$ verschiedener Bewegungsmodelle mit den experimentellen Daten verglichen. Das Ergebnis ist: einfache Modelle können die experimentellen Daten nicht reproduzieren. Mit Hilfe der MD-Simulationen wurde ein komplexes Modell einer exponentiellen Winkelverteilung mit Cutoff entworfen. Die Aussagekraft des Modells wird in der Diskussion besprochen.

Die aus MD-Simulationen gewonnene Winkelverteilung oder Orientierungstrajektorien können als Ausgangspunkt für die Random Walk-Simulationen verwendet werden. Diese Simulation wurde durchgeführt und die Ergebnisse sind in Kapitel 8.1.2 vorgestellt.

6.2.2 Berechnung der Spin-Gitter-Relaxationszeit

Im vorigen Kapitel wurden wichtige Linienformparameter für verschiedene Bewegungsmodelle mittels Random-Walk-Simulationen eines Konusmodells berechnet. In diesem Abschnitt wird nun untersucht, welche Spin-Gitter-Relaxationszeiten aus den Modellen folgen. Damit wird überprüft, welche der verschiedenen Modelle in Einklang mit den experimentellen Spin-Gitter-Relaxationszeiten sind.

Lipari und Szabo stellten in den 1980er Jahren einen Formalismus vor, um die Spin-Gitter-Relaxation für Zufallssprungprozesse innerhalb und auf dem Rand eines Konus mit einem halben Öffnungswinkel von $\chi < 50^\circ$ zu berechnen [165–167]. Diese Methode wurde von Oleg Petrov in ein C-Programm umgesetzt und hier verwendet. Der Code ist in Anhang A.4 abgedruckt.

In Abbildung 6.10(a) ist T_1 für Deuteronen bei $\omega_L = 46.1$ MHz für einige Winkel zwischen 1° und 50° als Funktion der Sprungkorrelationszeit aufgetragen. Abb. 6.10(b) zeigt die Abhängigkeit von T_1 vom Winkel für eine feste Sprungkorrelationszeit, die bis zu Winkeln von 20° Gleichung (6.3) genügt [23]

$$T_1 = B \frac{1}{\chi^2}. \quad (6.3)$$

Der Proportionalitätsfaktor B hängt von der Sprungkorrelationszeit τ und der Stärke der Quadrupolwechselwirkung δ ab.

Nun wurde für die drei Modelle die Spin-Gitter-Relaxationszeit berechnet (s. Abb. 6.10(c)-(e)). Dabei ist zu beachten, dass diese Berechnung sich auf das Modell

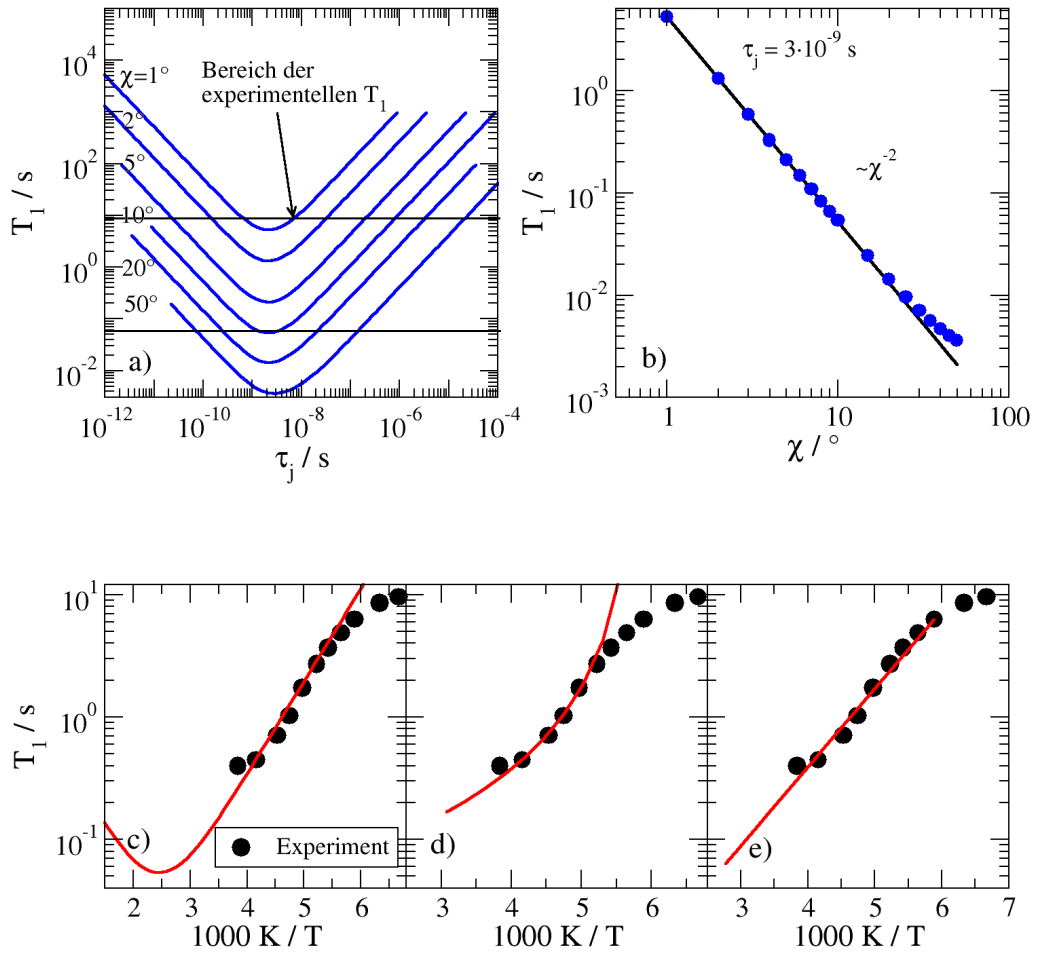


Abb. 6.10: a) Spin-Gitter-Relaxationszeit als Funktion der Sprungkorrelationszeit τ_j . Die eingezeichneten Linien markieren den Bereich der experimentell beobachteten T_1 -Zeiten b) zeigt die Abhängigkeit der T_1 -Zeit von der Winkelvariation für $\tau = 3 \cdot 10^{-9}$ s. c) - e) T_1 für die verschiedenen Modelle (rote Linien) im Vergleich zu den experimentellen T_1 -Daten (ausgefüllte schwarze Punkte) des Proteinrückgrats der hydratisierten Probe. c) Modell „Ratenänderung“ d) Modell „Amplitudenänderung“ e) Modell „Winkelverteilung“.

des Zufallssprungs auf einer Kegelgrundfläche bezieht, in Kapitel 6.2.1 hingegen das Modell des Zufallssprungs auf einem Konusrand verwendet wurde. Wie in Abb. 3.8(b) gezeigt, lassen sich die Modelle für kleine Winkel jedoch aufeinander skalieren, so dass lediglich ein quantitativer Unterschied zu erwarten ist.

Um die berechneten Daten mit den experimentellen Daten zu vergleichen, muss der Modellparameter (Rate, Amplitude) in eine Temperatur umgerechnet werden. Für das Modell „Ratenänderung“ wird ein Arrhenius-Gesetz (Gl. (2.9)) angenommen. Für das Modell „Amplitude“ und das Modell „Winkelverteilung“ ist der Weg im vorangegangenen Kapitel beschrieben.

Um T_1 für das Modell „Winkelverteilung“ zu berechnen, muss zunächst die Winkelverteilung in die zugehörige Relaxationszeitenverteilung umgerechnet werden. Aus $p(\chi)d\chi = p(T_1)dT_1$ folgt mittels der Beziehung (6.3) für die Verteilung $p(T_1)$

$$p(T_1) = \frac{\sqrt{B}}{2T_1^{3/2}} p(\chi). \quad (6.4)$$

Die beiden Verteilungen sind in Abbildung 6.11(a) und (b) abgebildet. Rechts sind die Winkelverteilungen für verschiedene charakteristische Winkel Γ_0 gezeigt, links ist die zugehörige T_1 -Verteilung zu sehen. Schließlich werden die Magnetisierungsaufbaukurven für verschiedene charakteristische Winkel Γ_0 berechnet

$$M(t) = \int_0^\infty dT_1 p(T_1) \exp(-t/T_1). \quad (6.5)$$

Sie sind in Abbildung 6.11(c) dargestellt. Die durchgezogenen Linien sind Kohlrausch-Williams-Watts-Fits nach Gleichung (2.10). Die berechneten Magnetisierungsaufbaukurven zeigen Abweichungen vom KWW-Verhalten. Die Anpassung ist aber noch hinreichend gut und die Fitwerte werden daher weiterverwendet.

Der Fitparameter T_1 ist in der Abbildung 6.10(e) im Vergleich zu den experimentellen Daten aufgetragen und der Streckungsparameter β ist in Abbildung 6.11(d) im Vergleich zu den experimentellen Daten gezeigt. Der Streckungsparameter ist temperaturunabhängig und reproduziert sogar näherungsweise quantitativ die experimentellen Werte. Für die einfachen Modelle „Amplitudenänderung“ und „Ratenänderung“ würden hingegen Streckungsparameter von $\beta = 1$ erwartet. Anhand des Streckungsparameters kann somit erneut bestätigt werden, dass ein komplexeres Modell notwendig ist, um die experimentellen Daten zu reproduzieren.

Alle Modelle passen die experimentellen Relaxationszeiten im mittleren Temperaturbereich gut an (s. Abb. 6.10(c-e)). Bei tiefen Temperaturen, wenn die Konusbewegung aufhört, ergeben sich Abweichungen zwischen den Modellen und dem Experiment. Hier übernimmt ein anderer Relaxationskanal den Magnetisierungsabfall, so dass es

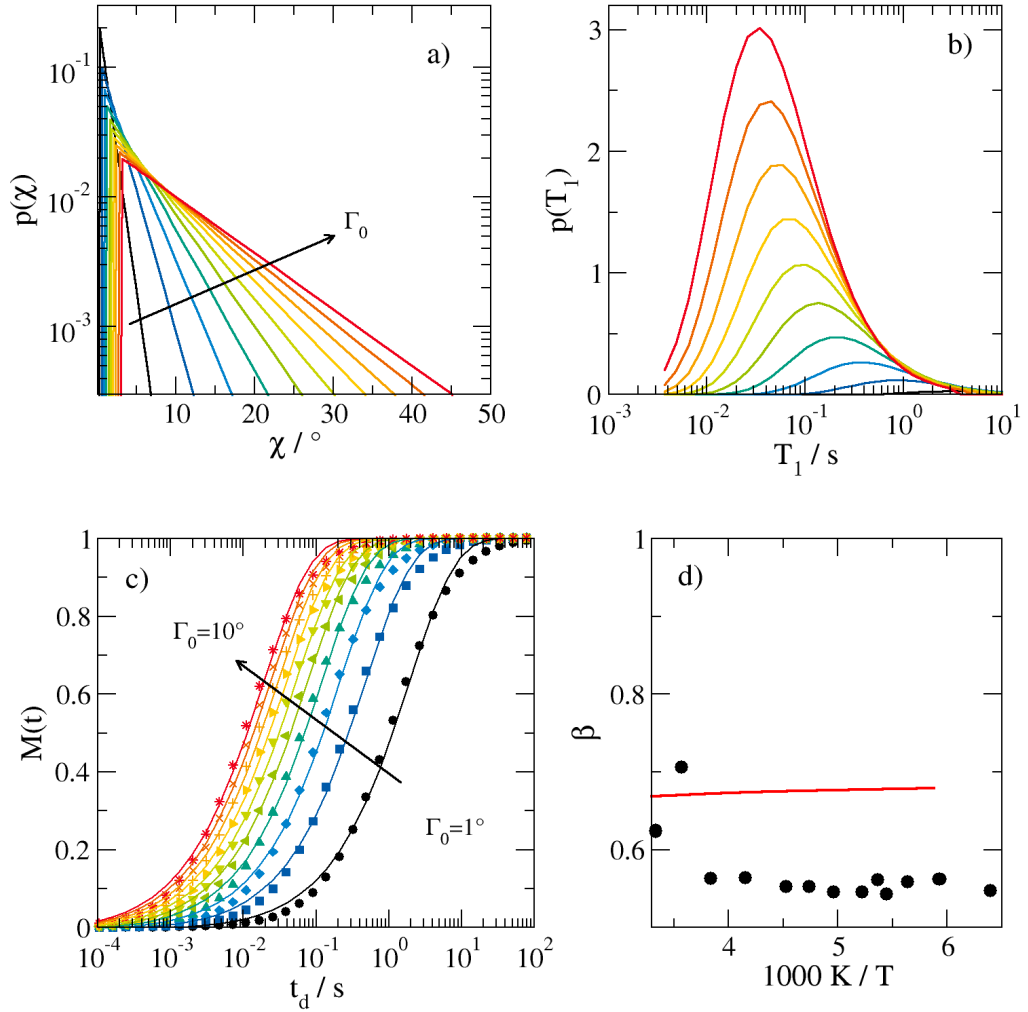


Abb. 6.11: a) Winkelverteilung für verschiedene charakteristische Winkel Γ_0 b) Daraus berechnete Verteilung der T_1 -Zeiten c) Magnetisierungsaufbaukurven, die aus der in (b) gezeigten Verteilung von T_1 berechnet wurden. Die durchgezogenen Linien sind Fits mit einem KWW nach Gleichung (2.10). Die daraus gewonnenen Werte des Streckungsparameters sind in d) aufgetragen (rote Linie) im Vergleich dazu sind die experimentellen Werte als schwarze Punkte gezeigt.

keine Übereinstimmung mit den experimentellen Daten geben muss. Eine Unterscheidung zwischen den Modellen ist mit Hilfe des Streckungsparameters möglich. Der experimentelle Wert von $\beta \approx 0.58$ kann nur unter Annahme einer Verteilung erreicht werden. Die für das Modell „Winkelverteilung“ verwendete exponentielle Verteilung mit Cutoff reproduziert diesen Wert fast quantitativ.

Das aus der Kombination von detaillierter Linienformanalyse (Parameter R/H_{40} , $\overline{\delta}/\delta$) mit Random-Walk-Simulationen und Informationen aus den MD-Simulationen gewonnene Modell einer Winkelverteilung beschreibt die Spin-Gitter-Relaxationszeiten und sogar den Streckungsparameter β und ist konsistent mit den experimentellen Ergebnissen der Stimulierten-Echo-Experimente. Allein aus der Analyse der Spin-Gitter-Relaxationszeiten kann nicht zwischen den Modellen diskriminiert werden. Die Kombination von Messung und Simulation von Spektren, Spin-Gitter-Relaxationszeiten und Stimulierten-Echo-Daten ermöglicht dies jedoch.

In diesem Kapitel wurden Konusmodelle verwendet, um verschiedene Temperaturabhängigkeiten der Bewegung von C-²H-Bindungen zu simulieren. Mit Random-Walk-Simulationen wurden ²H-NMR-Spektren berechnet und aus den berechneten Spektren verschiedene Linienformparameter evaluiert. Mittels des Formalismus nach Lipari und Szabo wurden weiterhin für drei Bewegungsmodelle die Relaxationszeiten berechnet.

Mit diesen Methoden ist es möglich zu unterscheiden, ob ein Modell den experimentellen Daten entspricht oder nicht. Im Fall des CPC wurde gefunden, dass einfache Konusmodelle nicht ausreichen, um die komplexe Rückgratdynamik zu beschreiben. Eine Annäherung an die experimentellen Daten konnte mit Hilfe einer Winkelverteilung gewonnen werden. Allerdings ist der Parameterraum für mögliche Modelle sehr groß und es kann

6.3 Literaturüberblick: NMR-Untersuchungen des Hydratationswassers

In der vorliegenden Arbeit wird sowohl die Protein als auch die Wasserdynamik mit verschiedenen Methoden untersucht. Die Charakterisierung der Proteindynamik mit ²-NMR-Spektroskopie ist im vorangegangenen Kapitel vorgestellt. Das Hydratationswasser wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten an verschiedenen Proteinen mit NMR-Spektroskopie untersucht und diese Untersuchung war nicht Teil dieser Arbeit. Die Charakterisierung des Hydratationswasser ist aber in Gegenstand der Neutronenstreuungsmessungen in Kapitel 7.2. Um die dort vorgestellten Daten einzuordnen, soll an dieser Stelle ein kurzer Literaturüberblick über Arbeiten zur Charakterisierung von Proteinhydratationswasser mit NMR-Spektroskopie gegeben werden.

Zur Untersuchung kam zum einen ²H-NMR-Spektroskopie zum Einsatz [173–175]. Damit kann die lokale Bewegung gemessen. Zum anderen wurden gepulste und statische Feldgradienten-¹H-NMR-Spektroskopie (PFG, SFG) eingesetzt [223, 225], um die Diffusion des Wassers über größere Längenskalen zu untersuchen.

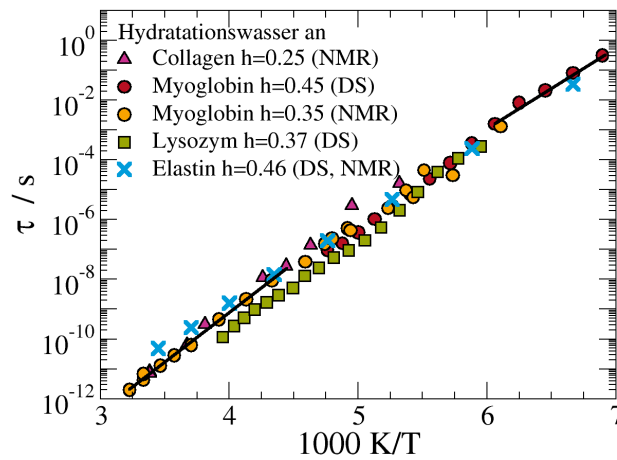


Abb. 6.12: Arrheniusplot der Korrelationszeiten des Proteinhydrationswassers von Elastin, Myoglobin, Lysozym und Collagen [89, 174].

In ^2H -NMR-Arbeiten von Vogel und Lusceac wurde der Mechanismus der Wasserreorientierung untersucht [174, 270]. Für hohe Temperaturen wird eine isotrope Bewegung beobachtet. Bei tieferen Temperaturen zeigen sich großwinklige Reorientierungen. Solche Großwinkelsprünge werden in MD-Simulationen bestätigt [271].

Mit Linienformanalyse, Stimulierten-Echo-Messungen und T_1 -Messungen wurden darüber hinaus die Korrelationszeiten des Hydrationswasser bestimmt und ein Arrhenius-Verhalten mit einer Aktivierungsenergie E_a von 0.66 eV für hohe Temperaturen und von ca. 0.55 eV für tiefe Temperaturen erhalten [175]. Geraden mit den entsprechenden Aktivierungsenergien sind in Abbildung 6.12 eingezeichnet. Dieses Verhalten wurde für verschiedene Proteine (Lysozym, Myoglobin, Collagen, Elastin) gefunden. Messungen mit Neutronenstreuung an CPC bestätigen das Arrheniusgesetz bei tiefen Temperaturen [59].

Diese Messungen stimmen quantitativ mit den Ergebnissen aus dielektrischer Spektroskopie überein [89]. In Kombination der Methoden konnte die Energiebarrierenverteilung des Hydrationswasser an Elastin, Collagen und Lysozym charakterisiert werden. Sie lässt sich mit einer Gaußform mit $E_a = 6600 \text{ K} = 0.57 \text{ eV}$ und einer Breite von $\sigma_E = 500 \text{ K} = 0.04 \text{ eV}$ beschreiben [173]. Die Art des Proteins spielt für die Wasserdynamik eine untergeordnete Rolle.

Messungen der Wasserdiffusion mit Gradienten-NMR-Spektroskopie ergeben ein anderes Bild: In einer Arbeit von Mallamace et al. [180] wurde mit gepulsten Feldgradienten NMR-Messungen Wasserdiffusion an Lysozym untersucht. Dabei wurde ein Fragil-Stark-Übergang bei $T = 223 \text{ K}$ gefunden. Dieses Ergebnis widerspricht den ^2H -NMR-Messungen und den Daten aus dielektrischer Spektroskopie.

Rosenstihl et al. charakterisierten den Messbereich [223, 225] von statischen und gepulsten Feldgradienten-Magneten und zeigten, dass der von Mallamace gefundene Fragil-Stark-Übergang mit hoher Wahrscheinlichkeit außerhalb des zuverlässigen Messbereichs der verwendeten Methode liegt.

Schließlich wurde Wasser auch an anderen Oberflächen charakterisiert. Sattig et al. verwendeten ^2H -NMR-Spektroskopie um Wasser in porösen Silicamatrizen (MCM) zu untersuchen [232]. Sie finden eine Temperaturabhängigkeit von Korrelationszeiten, die sehr gut mit den Korrelationszeiten des Hydratationswasser übereinstimmt. Dies legt nahe, dass es sich bei dem Wasserverhalten im Hydratationswasser von Proteinen um einen universellen Wasserprozess an rauen Oberflächen handeln könnte [224].

6.4 Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Kapitel wurde die Rückgratdynamik von vollständig deuteriertem CPC mit ^2H -NMR-Spektroskopie untersucht. Um das Verständnis der erhaltenen Ergebnisse zu vertiefen, wurden verschiedene Bewegungsmodelle mit Random-Walk-Simulationen auf ihre Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen überprüft.

Zur Charakterisierung der Proteindynamik wurde der volle zugängliche Zeitskalen Bereich der ^2H -NMR-Spektroskopie ausgenutzt, indem die drei Methoden Linienformanalyse, Spin-Gitter-Relaxation und Stimulierte-Echo-Experimente angewandt wurden. Die Kombination dieser Experimente ermöglicht es, kleinwinklige Bewegungen mit Amplituden von nur $1\text{-}2^\circ$ aufzulösen [273].

Mit ^2H -NMR-Spektroskopie lassen sich zwei Gruppen von Deuteronen in CPC, die Methylgruppen und die Rückgratdeuteronen, unterscheiden. Die Auswertung konzentrierte sich auf die Rückgratdynamik. Folgende Ergebnisse wurden gewonnen.

- Das Rückgrat führt eine kleinwinklige Bewegung aus, deren Amplitude sich mit der Temperatur vergrößert und deren Korrelationszeit klein ist ($\tau < 1\mu\text{s}$).
- Die Rückgratbewegung setzt mit Erwärmen bei Temperaturen $T > 180\text{ K}$ ein.
- Hydratationswasser verstärkt diese Bewegung.
- Die Bewegung ist komplex, d.h. zu ihrer Beschreibung müssen Winkel- oder Sprungzeitenverteilungen verwendet werden.
- Sie ist von der Art des Proteins unabhängig.
- Ein Teil des Rückgrats führt eine isotrope Bewegung aus, wenn Bulkwasser vorliegt.

Die vorgestellten Ergebnisse zur Protein-Rückgratdynamik stehen in Übereinstimmung mit anderen NMR-Untersuchungen. In diesen wurde die Rückgratbewegung ebenfalls

als kleinamplitudig und schnell charakterisiert [5, 176, 287]. Im Gegensatz zu diesen Studien finden wir durch die Kombination der drei NMR-Methoden Hinweise, dass sich mit der Temperatur vorrangig die Amplitude der Bewegung ändert und nicht allein die Korrelationszeit.


Das Einsetzen der Rückgratdynamik kann mit Untersuchungen zum dynamischen Übergang in Beziehung gesetzt werden. Das Einsetzen der kleinamplitudigen Dynamik fällt mit der unteren Temperatur des zwei-Stufen-Szenario zusammen [34, 60]. Diese Koinzidenz könnte darauf hindeuten, dass es sich bei der mit Neutronenstreuung beobachteten Erhöhung des mittleren Verschiebungsquadrats und der hier charakterisierten Rückgratbewegung um den gleichen Prozess handelt. Der zuvor gefundene dynamische Übergang bei $T = 220 - 240$ K [45] hingegen lässt sich in den Messungen nicht eindeutig zuweisen. Eine detailliertere Diskussion der Ergebnisse in Hinblick auf den dynamischen Übergang wird in Kapitel 8 vorgenommen.

Teil der Auswertung war die Berechnung von Linienformparametern und der Spingitter-Relaxationszeit mit Hilfe von Konusmodellen. Zwei Grenzfälle wurden dabei untersucht: zum einen die Änderung der Korrelationszeit mit der Temperatur bei gleichbleibender Geometrie der Bewegung im Modell „Ratenänderung“ und zum anderen die Änderung des Konusöffnungswinkels mit der Temperatur bei gleichbleibender Korrelationszeit der Bewegung im Modell „Amplitudenänderung“. Obwohl sich die Form der experimentellen Spektren sich nur wenig mit der Temperatur ändert, können mittels der Auswertung von Linienformparametern aus Random-Walk-Simulationen die Modelle deutlich unterschieden werden.

Am Beispiel des Modells „Amplitudenänderung“ wird gezeigt, dass die Übereinstimmung eines Parameters allein nicht ausreicht, um ein Modell als gültig anzunehmen oder zu verwerfen. Die spektrale Breite passt sehr gut, das Modell reproduziert jedoch die relative zentrale Intensität nicht. Es werden komplexere Modelle zur Beschreibung benötigt.

Mit Rückgriff auf die in MD-Simulationen gefundene Winkelverteilung wird das komplexe Bewegungsmodell „Winkelverteilung“ erstellt. Es geht von einer exponentiellen Verteilung von Winkeln mit einem Cutoff bei kleinen Winkeln aus, dessen charakteristischer Winkel sich mit der Temperatur erhöht. Mit diesem Modell lassen sich die Linienformparameter annähern.

Bei der Modellierung von komplexer Dynamik mit Konusmodellen wird allerdings schnell die Anzahl von freien Parametern unüberschaubar groß und die Aussagekraft der Modelle beeinträchtigt. So ist das Modell „Winkelverteilung“ keineswegs als realistische Darstellung der tatsächlichen Rückgratbewegung zu verstehen, sondern nur als ein mögliches Modell von vielen aufzufassen. Das Modell zeigt beispielhaft, welchen Einfluss Winkelverteilungen auf die NMR-Parameter haben können.



An diese Charakterisierung der Rückgratdynamik mittels ^2H -NMR-Spektroskopie schließt sich im folgenden Kapitel die Analyse der Protein und Hydratationswasserdynamik mittels quasielastischer Neutronenstreuung an.

7 Untersuchung der Protein- und Wasserdynamik mit quasielastischer Neutronenstreuung

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Messungen von Protein- und Wasserdynamik mit quasielastischer Neutronenstreuung beschrieben. Untersucht wurde das Protein Elastin und die Messungen wurden am Rückstreuспекrometer SPHERES am Forschungsreaktor II in München durchgeführt.

Quasielastische Neutronenstreuung wurde bereits vielfach zur Untersuchung von Proteinen eingesetzt [87]. Dabei wurde das Einsetzen eines dynamischen Prozesses, ein dynamischer Übergang, bei ca. 200-240 K gefunden (vgl. Kap. 2.3). In der vorliegenden Untersuchung wird Elastin verwendet, dessen Glasübergangstemperatur für einen Hydratationsgrad $h < 0.3$ g/g bei $T > 300$ K [229] liegt (vgl. Abb. 4.2).

Wie verhält sich ein Protein, dessen Glasübergangstemperatur oberhalb von 300 K liegt? Bei welcher Temperatur setzt die Rückgratdynamik ein? Ist ein dynamischer Übergang sichtbar? Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die beobachtete Proteindynamik von der Methylgruppendynamik dominiert wird. Hinweise auf ein Einsetzen von Rückgratbewegung werden nicht gefunden.

Neutronenstreuung misst die Streuung an Protonen. Deuteronen sind für die Methode fast unsichtbar. Durch Messungen zweier Proteinproben, die eine mit H_2O (im Folgenden ELA_ H_2O genannt) hydratisiert und die andere mit D_2O (ELA_ D_2O) kann der Streubeitrag des Wassers extrahiert werden, und damit die Wasserdynamik charakterisiert werden. Es wurden zwei Messreihen durchgeführt. Zunächst wurde Elastin mit einem Hydratationsgrad von 0.4 g/g vermessen. In dieser Probe wurde jedoch die Signatur von kristallinem Eis gefunden (s. Kap. 4). Die vorgestellten Ergebnisse stammen daher soweit nicht anders angegeben von der zweiten Messreihe mit einem Hydratationsgrad von $h = 0.2$ g/g.

Auch die Wasserdynamik des Proteinhydrationswassers wurde bereits mit Rückstreuungsmethoden charakterisiert. Die hierbei gewonnenen Ergebnisse sind widersprüchlich: Chen et al. [40] fanden einen Fragil-Stark-Übergang (FST) bei $T = 225$ K, während Doster et al. [59] zeigen konnten, dass eine alternative Datenauswertung derselben Daten keine Hinweise auf einen FST liefert.

Die Probenpräparation und -charakterisierung wurden in Kapitel 4.3 erläutert. Nachfolgend wird zunächst auf die Charakterisierung der Proteindynamik eingegangen und dann die Analyse der Wasserdynamik vorgestellt.

7.1 Charakterisierung der Proteindynamik in Elastin

In diesem Abschnitt wird die Charakterisierung der Proteindynamik vorgestellt. Dazu wird hauptsächlich die mit deuteriertem Wasser hydratisierte Elastinprobe herangezogen. Wie bereits im vorangegangenen Kapitel werden zunächst die Rohdaten ohne Modellanpassung beschrieben und interpretiert. Daran anschließend wird dann das Rotationsraten-Verteilungsmodell herangezogen, um die Daten zu beschreiben

7.1.1 Experimentelle Daten

Die durchgeführten Neutronenstreuexperimente ergeben drei Messgrößen, die separat ausgewertet und in einzelnen Abschnitten behandelt werden: Die elastische Intensität, die quasielastischen Temperaturscans sowie die Spektren im vollen Energiebereich bei 240 K und 270 K.

Elastische Intensität

Die Streuung von Neutronen an einer Probe kann elastisch oder inelastisch erfolgen, je nachdem, ob der Streuer immobil ist, oder sich bewegt. Die Unterscheidung, welche Streuer als bewegt und welche als immobil gesehen werden, ist zum einen über die Auflösung des Spektrometers festgelegt und zum anderen über den betrachteten Streuvektor. Dieser gibt die Längenskala vor, mit der die Bewegung der Protonen verglichen wird. Die Streuung kann elastisch oder inelastisch erfolgen. Hier wird zunächst die elastische Streuung betrachtet. Die elastische Streuung kann, wie in Kap. 3.3 erläutert, als Funktion der Temperatur aus quasielastischen Temperaturscans gewonnen werden.

Abbildung 7.1(a) zeigt den Temperaturverlauf der normierten elastischen Intensität $I_{El}(T)/I_{El}(4\text{K})$ der Probe ELA_D₂O für verschiedene Streuvektoren. Zum Vergleich ist für $q = 0.6\text{\AA}^{-1}$ und $q = 1.84\text{\AA}^{-1}$ die elastische Intensität für die Probe ELA_H₂O gezeigt (Punkte). Bei $q = 1.84\text{\AA}^{-1}$ stimmen die Intensitäten überein. Bei kleinen Streuvektoren und hohen Temperaturen (ca. Raumtemperatur) ist die Streuintensität der Probe mit H₂O etwas geringer. Dies ist auf den zusätzlichen quasielastischen Streuanteil der Wasserprotonen zurückzuführen. Der geringe Unterschied zwischen den Proben zeigt, dass die Abnahme der elastischen Intensität hauptsächlich von Streuung am Protein und nicht am Wasser verursacht wird.

Als nächstes wurde das mittlere Verschiebungsquadrat (MSD) aus den quasielastischen Temperaturscans ermittelt. Das MSD wird, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, aus der elastischen Intensität unter Annahme der gaußschen Näherung berechnet. Abbildung 7.1(b) zeigt die so erhaltenen Werte für beide Proben. Die gaußsche Näherung ist eine grobe Näherung und ihre Gültigkeit wird in der Diskussion besprochen.

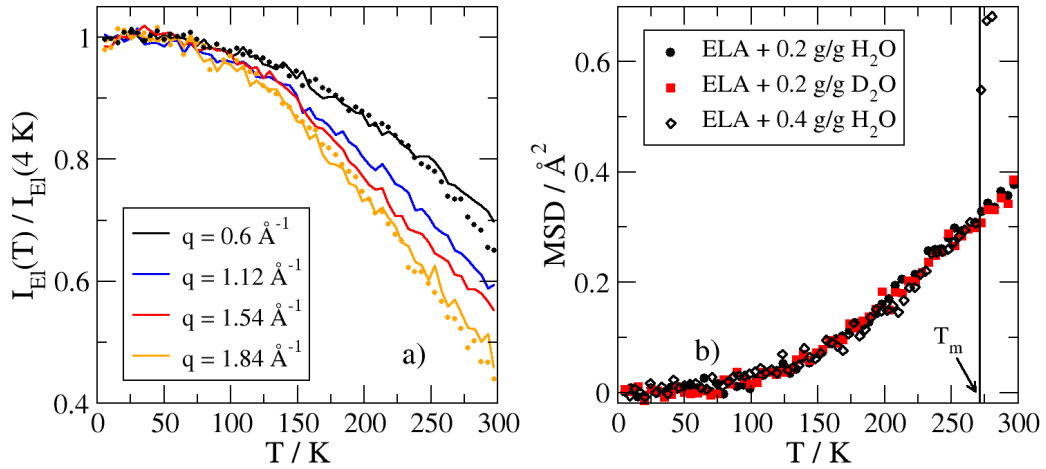


Abb. 7.1: a) Elastische Intensität der Probe ELA_D₂O für verschiedene Streuvektoren q (Linien). Zum Vergleich sind für $q = 1.84\text{ \AA}^{-1}$ und $q = 0.60\text{ \AA}^{-1}$ die Werte der Probe ELA_H₂O als Punkte eingezeichnet. b) Mittleres Verschiebungsquadrat der Elastinproben mit einem Hydratationsgrad von $h = 0.2\text{ g/g}$ und für Elastin mit $h = 0.4\text{ g/g}$ H₂O. Das Zeitfenster des Experiments endet bei $\tau_{res} = 1.8\text{ ns}$.

Das mittlere Verschiebungsquadrat steigt ab ca. 120-150 K stärker als bei tieferen Temperaturen an. Der Anstieg ist in guter Näherung linear mit der Temperatur. Ein Ansteigen des MSD in diesem Temperaturbereich wurde bereits in anderen Protein- und Polypeptidproben unterhalb der Temperatur des dynamischen Übergangs gefunden [221, 234] und wird auf das Einsetzen von Methylgruppenrotation zurückgeführt [221, 222] und nicht auf den dynamischen Übergang. Bei höheren Temperaturen ist keine zusätzliche Änderung der Steigung zu beobachten. Das mittlere Verschiebungsquadrat zeigt demnach keinen Hinweis auf einen dynamischen Übergang in Elastin.

Im Vergleich der beiden Proben mit $h = 0.2\text{ g/g}$ ELA_H₂O und ELA_D₂O wird über den gesamten Temperaturbereich eine hohe Übereinstimmung gefunden. Die Wasserprotonen tragen demnach nur wenig zum Abfall der elastischen Intensität, bzw. zum Anstieg des MSD bei. Der beobachtete Anstieg des MSD muss folglich auf Proteindynamik zurückzuführen sein.

Zusätzlich ist in dieser Grafik das MSD für eine höher hydratisierte Probe ELA_H₂O mit $h = 0.4\text{ g/g}$ gezeigt. Das MSD stimmt für alle Proben unterhalb von 273 K überein und ist in diesem Bereich somit unabhängig vom Hydratationsgrad. Dies lässt sich damit erklären, dass ein Teil des Hydratationswassers in der Probe mit $h = 0.4\text{ g/g}$ als Bulkwasser vorliegt und ist bei $T < 270\text{ K}$ gefroren ist. Er unterstützt somit nicht die Dynamik des Proteins und trägt auch selbst nicht zur quasielastischen Streuung bei. Bei $T \approx 270\text{ K}$ schmilzt der gefrorene Anteil. Infolgedessen wird das Wasser mobil, dadurch ändert sich das MSD sprunghaft. Bei tiefen Temperaturen ist die Proteindynamik in beiden Proben folglich nur durch die Hydrathülle beeinflusst, die in beiden Proben einen ähnlichen Hydratationsgrad ausmacht. Die gefundene Übereinstimmung ist be-

merkwürdig und spricht für die Qualität des Instruments, stammen die Datensätze doch aus zwei verschiedenen Messzeiten.

Die elastische Intensität und das MSD liefert keinen Hinweis auf einen dynamischen Übergang in Elastin. Jedoch zeigt sie, dass ein dynamischer Prozess des Proteins stattfindet. Durch die Auswertung des quasielastischen Anteils der Streuung kann dieser dynamische Prozess genauer charakterisiert werden, wie im nächsten Teil beschrieben.

Quasielastische Intensität

Das Abnehmen der elastischen Intensität indiziert, dass ein Teil der Streuung quasielastisch oder inelastisch geschieht. Ein Teil des Abfalls findet sich folglich als quasielastische Intensität wieder, ein Teil der Intensität liefert Beiträge außerhalb des quasielastischen Energiefensters, wie die Auftragung der Gesamtintensität in Abbildung 3.9 zeigt. Der quasielastische Anteil wurde mit quasielastischen Temperaturscans im Energiebereich $|\omega| < 3 \mu\text{eV}$ gemessen.

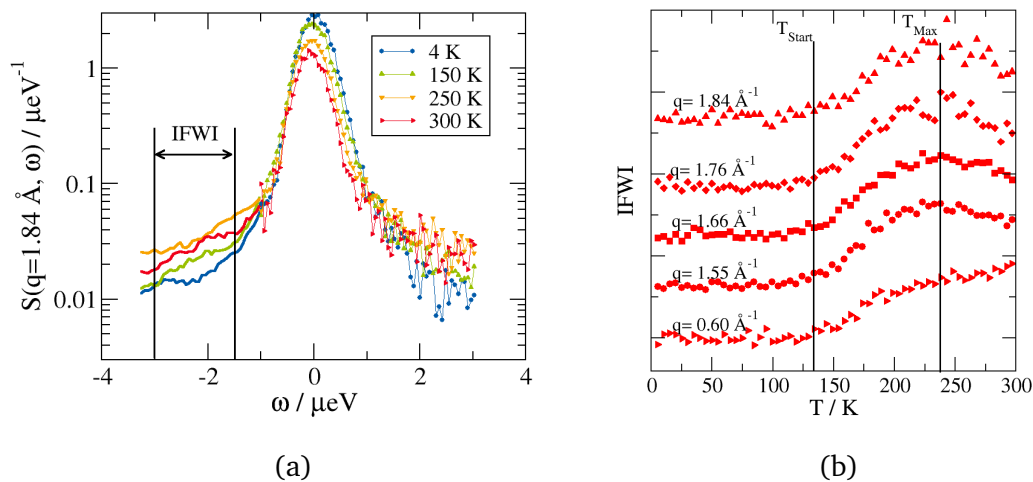


Abb. 7.2: a) Quasielastische Spektren der Probe Elastin mit $h = 0.2 \text{ g/g}$ im Energiebereich $\omega < 3 \mu\text{eV}$ für vier Temperaturen. Im Energiebereich $\omega \leq -1 \mu\text{eV}$ ist zur Reduktion der Streuung der laufende Mittelwert über 10 benachbarte Werte gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die quasielastische Intensität für in diesem Energiebereich mit der Temperatur zunächst steigt, für hohe Temperaturen aber wieder sinkt. b) Auftragung der im Energiebereich $-3 < \omega < -1.5 \mu\text{eV}$ integrierten quasielastischen Intensität (IFWI) als Funktion der Temperatur für verschiedene q .

Die quasielastische Intensität kann mittels inelastischer Fenstermessungen ausgewertet werden. Das Prinzip der inelastischer Fenstermessung ist in Abbildung 7.2(a) veranschaulicht. Aufgetragen sind die quasielastischen Spektren für vier verschiedene Temperaturen. Der Abfall der elastischen Intensität ist im Zentrum des Spektrums sichtbar. In den Flügeln des Spektrums ist zu beobachten, dass die Intensität in Abhängigkeit der Temperatur ein Maximum durchläuft. Die quasielastische Intensität wird nun in einem

Frequenzfenster von -3 bis $-1.5 \mu\text{eV}$ gemittelt. Die so gewonnene Größe wird als „inelastic fixed window intensity“ (IFWI) bezeichnet [82, 101, 256].

Bei dieser Methode wird analog zur Messung der Spin-Gitter-Relaxationszeit in der NMR-Spektroskopie [101] für eine feste Frequenz ω_{fix} der Wert des dynamischen Strukturfaktors in Abhängigkeit der Temperatur gemessen. Für einen einfachen Debye-Prozess gilt nach Gleichung (3.21):

$$IFWI(T) = \frac{B}{\pi} \frac{\tau(T)}{1 + \tau(T)^2 \omega_{\text{fix}}^2} = B \mathcal{L}_i(\omega, \tau). \quad (7.1)$$

Für $\tau \omega_{\text{fix}} \approx 1$ ergibt sich als Funktion der Temperatur ein Maximum, das für einen Arrhenius-Prozesse von der Höhe der Energiebarriere E_a und der Versuchsfrequenz τ_0 abhängt [82]:

$$T_{\text{max}} = \frac{E_a/k_B}{\ln(\omega_{\text{fix}} \tau_0)^{-1}}. \quad (7.2)$$

Große Aussagekraft hat die Streuvektorabhängigkeit. Hieraus können qualitative Aussagen über die Art der Bewegung gewonnen werden. Für verschiedene Rotations-sprungmodelle gibt es keine oder nur eine geringe Streuvektorabhängigkeit des Maximums im inelastischen Fensterscan¹, während eine diffusive Bewegung² eine Verschiebung des Maximums mit steigendem q zu kleineren Temperaturen beinhaltet [82, 260].

In Abbildung 7.2(b) ist die IFWI für verschiedene Streuvektoren q aufgetragen. Die Kurven sind zur besseren Unterscheidbarkeit gegeneinander auf der y-Achse verschoben. Alle Kurven zeigen die Signatur eines dynamischen Prozesses, der bei $T = 120 \text{ K}$ ins Fenster kommt und bei ca. $T = 240 \text{ K}$ zu einem Maximum führt. Für den Streuvektor $q = 0.6 \text{ \AA}^{-1}$ tritt bei hohen Temperaturen ein zweiter Prozess hinzu, der offenbar streuvektorabhängig ist. Dieser hat nur einen geringen Anteil an der quasielastischen Streuintensität.

Es können somit zwei Prozesse in der quasielastischen Intensität identifiziert werden. Zum einen ein lokaler, q -unabhängiger Prozess, der den Hauptbeitrag der Streuung ausmacht und folglich auf die Proteindynamik zurückgeführt wird. Zum anderen wird bei hohen Temperaturen ein Beitrag geringerer Intensität gefunden, dessen Maximum q -abhängig ist. Er wird im Kapitel 7.2 der Wasserdynamik zugeschrieben.

Spektren im vollen Energiebereich

Ergänzt wurden die Messungen durch die Aufnahme von Spektren über den vollen zugänglichen Energiebereich des Spektrometers $-30 \mu\text{eV} \leq \omega \leq 30 \mu\text{eV}$ bei drei Temperaturen, $T = 4 \text{ K}$, $T = 240 \text{ K}$ und $T = 270 \text{ K}$. Die Spektren bei höheren Temperaturen

¹ Eine Streuvektorabhängigkeit ergibt sich, wenn die Halbwertsbreite $\Delta\omega$ der Streufunktion q -abhängig ist. Dies ist für Zwei- und Dreiplatzsprünge auf einem Kreis nicht der Fall. Für Mehrfachsprünge auf einem Kreis gibt es eine geringe q -Abhängigkeit der Halbwertsbreite [16].

² Für eine diffusive Bewegung gilt: $\Delta\omega = Dq^2$ [16].

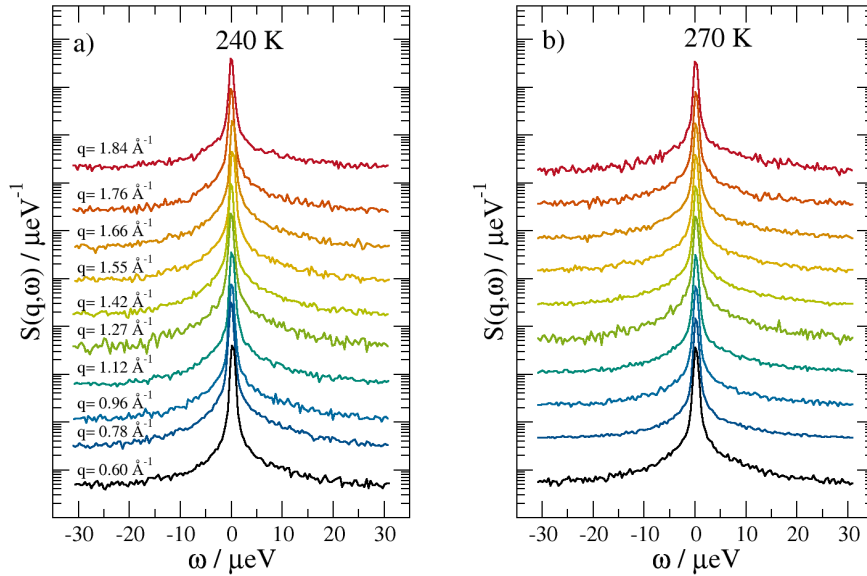


Abb. 7.3: Logarithmisch skalierte Spektren der Probe Elastin $h = 0.2 \text{ g/g}$ im gesamten Energiebereich des Spektrometers $\pm 30 \mu\text{eV}$ für verschiedene Streuvektoren q bei a) $T = 240 \text{ K}$ und b) $T = 270 \text{ K}$. Die Spektren sind gegeneinander auf der y-Achse verschoben. Zum Vergleich ist jeweils bei $q = 0.6 \text{ \AA}^{-1}$ das Spektrum bei 4 K gezeigt.

wurden auf das Tieftemperaturpektrum normiert. Die erhaltenen Spektren sind für die Streuvektoren $0.6 \text{ \AA}^{-1} \leq q \leq 1.84 \text{ \AA}^{-1}$ in Abbildung 7.3 gezeigt.

Die Spektren bestehen aus einer elastischen Linie und einer quasielastischen Verbreiterung. Eine eindeutige q -Abhängigkeit ist den Spektren nicht zu entnehmen. Dies bestätigt die Annahme eines lokalen Prozesses als Ursache der Verbreiterung.

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse aller Messgrößen:

- In Elastin ist Dynamik sichtbar, es gibt jedoch keinen dynamischen Übergang.
- Die Dynamik wird von einem Prozess dominiert, der
 - nicht durch Wasserprotonen hervorgerufen wird, da er in den Proben ELA_H₂O und ELA_D₂O gleichstark ausgeprägt ist,
 - bei $T \approx 120 \text{ K}$ einsetzt,
 - im Frequenzfenster $-3 \mu\text{eV} < \omega < -1.5 \mu\text{eV}$ ein q -unabhängiges Maximum bei $T = 240 \text{ K}$ durchläuft.
- Zusätzlich gibt es einen nichtlokalen, q -abhängigen Prozess, der nur eine geringe Intensität hat.

Der nichtlokale Prozess wird der Wasserdynamik zugewiesen, wie in Kapitel 7.2 gezeigt.

Die Eigenschaften der beobachteten Proteindynamik, d.h. das Einsetzen des Prozesses unabhängig vom Hydratationsgrad bei ca. 120 K und das streuvektorunabhängige Maximum in der IFWI, stimmen mit den Kennzeichen für Methylgruppendifynamik, die in der Literatur beschrieben sind, überein: Roh et al. demonstrierten die Hydratationsgradunabhängigkeit der Methylgruppendifynamik [221,222], sowie deren Einsetzen bei tiefen Temperaturen. Telling et al. werteten die Methylgruppendifynamik mit Hilfe von IFWI aus und fanden ein streuvektorunabhängiges Maximum bei ca. 250 K in verschiedenen Proteinen [256]. Einen eindeutigen Hinweis auf die Zuordnung dieses Prozesses zur Methylgruppendifynamik liefert darüber hinaus die Studie von Schiro et al [234]. Bei der Untersuchung von Homopolymeren aus Alanin und Glyzin³ wurde gezeigt, dass in Polyalanin die Anharmonizität im Temperaturbereich von 100-120 K einsetzte, während in Glyzin in diesem Temperaturbereich ein Anstieg des MSD ausblieb.

Im Folgenden wird daher ein Modell für die Methylgruppendifynamik zur Analyse herangezogen.

7.1.2 Interpretation mit dem Rotationsraten-Verteilungsmodell

Die Analyse der Messdaten zeigt, dass der Hauptbeitrag der Dynamik in Elastin durch eine lokale Proteinbewegung verursacht wird, die bereits bei tiefen Temperaturen einsetzt und vom Hydratationsgrad unabhängig ist. Diese Hinweise lassen darauf schließen, dass es sich bei der beobachteten Bewegung um die Methylgruppenbewegung handelt [222,256].

In der vorliegenden Probe ist der Anteil der Protonen in Methylgruppen, wie in Kap. 4.3.4 beschrieben, etwa 30% der Proteinprotonen. Dieser Wert ist typisch für Proteine [148,221,234].

Methylgruppen führen eine schnelle Dreiplatzsprungbewegung aus, die einer Arrhenius-Temperaturabhängigkeit folgt [44]. In Proteinen und Polymeren befinden sich Methylgruppen in verschiedenen lokalen Umgebungen, die die Höhe der jeweiligen Energiebarrieren bestimmt. Dieser Heterogenität trägt das Rotationsraten-Verteilungsmodell (engl. rotational rate distribution model (RRDM)) Rechnung [44], indem von einer Gaußverteilung von Energiebarrieren ausgegangen wird

$$g(E) = N \exp \left(-\frac{(E - E_m)^2}{2\sigma_E^2} \right). \quad (7.3)$$

E_m die mittlere Energiebarrierenhöhe, σ_E die Breite der gaußschen Energiebarrierenverteilung und N die Normierungskonstante. Das RRDM wurde zuvor in der Literatur bereits mehrfach zur Beschreibung von Methylgruppendifynamik in Proteinen verwendet [221,222,234,256]. Nun wird es zur Charakterisierung des Elastins angewandt.

³ Alanin und Glyzin unterscheiden sich lediglich durch eine Methylgruppe in der Seitenkette.

Bei der Analyse der inelastischen Fenstermessungen in Abbildung 7.2(b) konnten Hinweise auf zwei dynamische Prozesse gefunden werden. Den lokalen, mutmaßlichen Methylgruppenprozess und einen nichtlokalen, q -abhängigen Prozess, der bei großen q verschwindet. Um die Methylgruppendiffusionsdynamik zu isolieren werden im folgenden nur Daten bei großen Streuvektoren ($q \geq 1.55 \text{ \AA}^{-1}$) verwendet. Gelingt es, die Methylgruppenbewegung genau zu parametrisieren, so kann der zweite dynamische Prozess abgetrennt und isoliert untersucht werden.

Beginnen wird mit der Beschreibung der inelastischen Fenstermessungen. Gleichung (7.4) muss folglich nun für eine Verteilung von Korrelationszeiten $G(\tau)$ modifiziert werden

$$IFWI(T) = \frac{B}{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} g(\tau) \frac{\tau(T)}{1 + \tau(T)^2 \omega_{\text{fix}}^2} d\tau. \quad (7.4)$$

Für eine Arrhenius-Temperaturabhängigkeit $\tau_m = \tau_0 \exp(E_m/T)$ und mit $\sigma_E = T\sigma$ lässt sich aus Gleichung (7.3) die Verteilung der Korrelationszeiten berechnen:

$$g(\ln \tau) = N \exp \left[-\frac{(\ln(\tau/\tau_m))^2}{2\sigma^2} \right]. \quad (7.5)$$

Diese Verteilung wird nun in Gleichung (7.4) eingesetzt. Zur Beschreibung der Messdaten müssen nun noch der Untergrund b und eine Amplitude A_1 berücksichtigt werden. Die finale Gleichung lautet also:

$$IFWI(T) = b + A_1 \int_{-\infty}^{\infty} g(\ln \tau) \frac{\tau(T)}{1 + \tau(T)^2 \omega_{\text{fix}}^2} d \ln \tau. \quad (7.6)$$

ω_{fix} wird durch den Frequenzbereich des Fensters $\omega_{\text{fix}} = 2.25 \mu\text{eV}$ festgelegt ⁴.

Mit diesem Modell wurden die vier Kurven bei den größten Streuvektoren q in einem Multikurvenfit angepasst. Der Mittelwert der Energiebarrierenverteilung E_m und die Breite der Energiebarrierenverteilung σ_E wurden als globale Fitparameter angepasst.

Beim Fitten können nicht alle drei Parameter: E_m , σ_E und τ_0 separat bestimmt werden, da sie nicht voneinander unabhängig sind⁵. Der Parameter τ_0 wurde daher zunächst wie in [256] auf $\tau_0 = 10^{-13} \text{ s}$ festgesetzt. Dieser Versuchsfrequenz wurde in den Studien von Grapengeter an Methylgruppen gefunden [101].

⁴ Bei der Auswertung wurde getestet, ob die Breite des gewählten Fensters die Fitwerte stark beeinflusst, dies ist jedoch nicht der Fall, so dass die Abbildung des gesamten Frequenzbereichs auf den mittleren Wert zulässig ist.

⁵ Dies wurde bereits in [82] ausführlich dargelegt. Wie mit Hilfe der Parameter E_a und τ_0 die Breite des Maximums der IFWI-Werte verändert werden kann, ist in Abb. 5 in der Arbeit von Frick gezeigt.

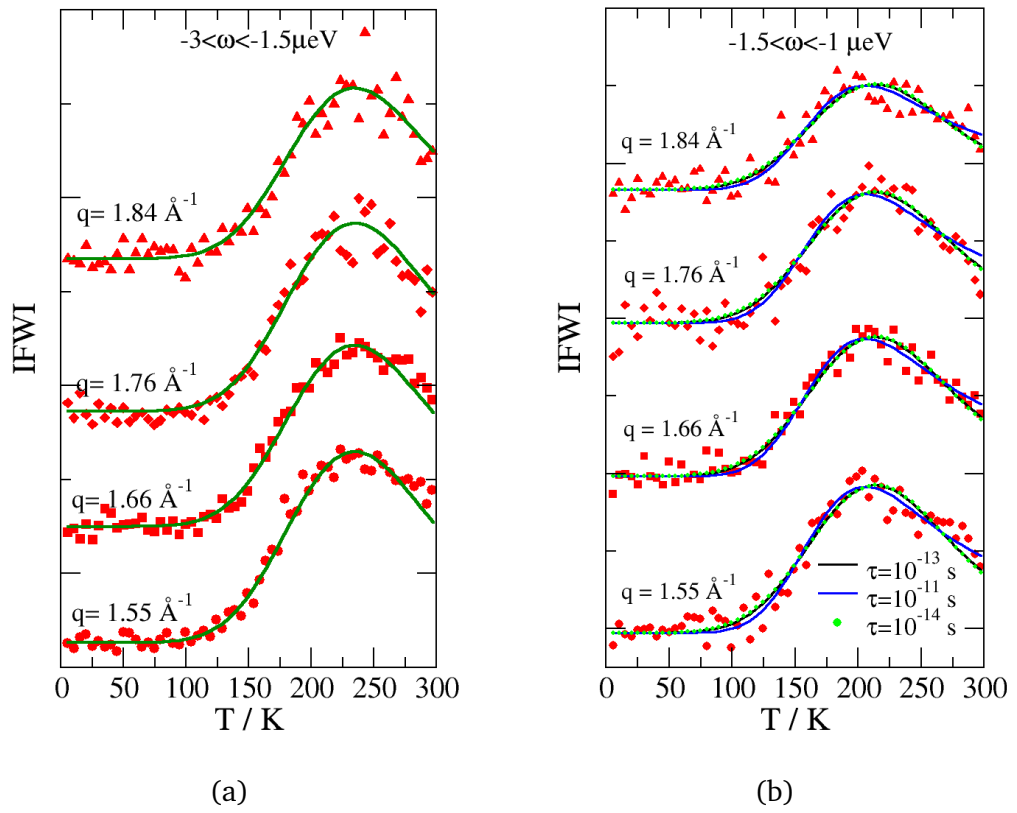


Abb. 7.4: IFWI für große q und Fits mit Gleichung (7.6): a) im Bereich $-3 < \omega < -1.5 \mu\text{eV}$ mit $\tau_0 = 10^{-13}$ und b) im Bereich $-1.5 < \omega < -1.0 \mu\text{eV}$ mit verschiedenen τ_0 .

Die Fits sind als durchgezogene Linien in Abb. 7.4(a) eingezeichnet. Die so gewonnenen Parameter der Energiebarrierenverteilung von $E_a = 0.167 \text{ eV}$ und $\sigma_E = 0.04 \text{ eV}$ ⁶ sind in der Tabelle 7.1 einigen Literaturwerten für Methylgruppenbewegung in Proteinen gegenübergestellt. Die Übereinstimmung mit den Literaturwerten ist exzellent.

Tab. 7.1.: Werte der experimentell bestimmten Energiebarrierenverteilung für die Methylgruppen im Literaturvergleich.

Referenz	E_m/eV	σ_E / eV	Protein
eigene Messung	0.167	0.04	Elastin
Telling et al. [256]	0.176	0.04	Apoferitin
Schiro et al. [234]	0.161	0.03	Myoglobin
Roh et al. [222]	0.172	0.06	Lysozym

Nun wurde überprüft, welchen Einfluss die Annahme der Versuchsfrequenz τ_0 hat. Die Fits für verschiedene τ_0 sind in Abb. 7.4(b) dargestellt. Die gefitteten Daten sind hier die inelastische Fensterintensitäten im Bereich $-1.5 \mu\text{eV} < \omega < -1 \mu\text{eV}$. Dieser Energiebereich hat den Vorteil, dass die hintere Flanke des IWFI über einen größeren Temperaturbereich sichtbar ist. Alle Fits passen die Daten fast ununterscheidbar gut an.

Die Fitwerte sind in Tabelle 7.2 dargestellt. Durch die Variation von τ_0 im physikalisch sinnvollen Bereich von 10^{-11} - 10^{-14} s ändert sich die mittlere Energiebarrierenhöhe um den Faktor 4. Damit geht eine Änderung der Verteilungsbreite um etwa denselben Faktor einher. Unter Annahme einer Versuchsfrequenz in diesem Bereich kann also zwar einerseits ausgeschlossen werden, dass die IFWI-Werte von einer einzelnen Energiebarriere verursacht werden, eine genaue Bestimmung der Parameter ist andererseits aber nicht eindeutig möglich.

Die Methylgruppendiffusionsdynamik ist für alle Proteine unter Annahme derselben Versuchsfrequenz gleich. Aufschluss darüber, ob die hier angenommene Versuchsfrequenz zutreffend ist oder nicht, kann folglich auch aus der Untersuchung des CPC mit Hilfe von NMR-Experimenten in Kapitel 6 gewonnen werden. Die tatsächliche Energiebarrierenverteilung der Methylgruppen muss auch das Minimum der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 bei $T = 180 \text{ K}$ (vgl. Abb. 6.4) erklären⁷. Die Breite der Verteilung bestimmt den Wert von T_1 im Minimum.

Für die Werte der Verteilung in Tabelle 7.2 kann somit geprüft werden, ob diese Werte die mit NMR-beobachtete Methylgruppendiffusionsdynamik erklären. Hierfür wird ausgenutzt, dass im Minimum der temperaturabhängigen Spin-Gitter-Relaxationszeit $\tau\omega_L \approx 1 \text{ ns}$

⁶ Eine Fehlerabschätzung für die gewonnenen Werte kann aus der in Tabelle 7.2 zusammengestellten Variation der Versuchsfrequenz entnommen werden. Bei Änderung der Startparameter ändern sich die erhaltenen Werte bis zu einem Faktor 4.

⁷ Bei diesem Vergleich ist zu beachten, dass mit NMR-Spektroskopie die schwereren Deuteronen gemessen wurden, während in der Neutronenstreuung die Protonendynamik analysiert wird.

Tab. 7.2.: Werte der experimentell bestimmten Energiebarrierenverteilung für die Methylgruppen bei verschiedenen Versuchsfrequenzen.

τ_0 / s	E_m / eV	σ_E / eV	$T(\tau = 1 \text{ ns}) / \text{K}$
10^{-14}	0.201	0.056	203
10^{-13}	0.165	0.042	210
10^{-11}	0.091	0.012	229

gilt. In der vierten Spalte sind die nach dem Arrheniusgesetz berechneten Temperaturen $T(\tau = 1 \text{ ns})$ berechnet. Das experimentell in CPC beobachtete Minimum liegt bei $T = 180 \text{ K}$. Es liegt damit niedriger als die aus den Energiebarrierenverteilungen berechneten Werten. Die Abweichung von 20 K ist jedoch recht klein. Die Versuchsfrequenz $\tau = 1 \cdot 10^{-14} \text{ s}$ führt zu der geringsten Temperatur des T_1 -Minimums und kommt dem Ergebnis der NMR-Spektroskopie am nächsten.

Um die Vergleichbarkeit mit den anderen Experimenten der Neutronenstreuung zu wahren, werden im weiteren Verlauf trotzdem die Parameter aus Tabelle 7.1 weiterverwendet.

Das vorgestellte Modell für die Methylgruppendynamik wird nun einer Konsistenzüberprüfung unterzogen. Dabei wird geprüft, ob die ermittelten Parameter konsistent mit der Spektrenform sind.

Die Formel zum Fitten der Spektren soll im Folgenden kurz motiviert werden. Für einen Dreiplatzsprung, wie er von den Methylgruppen ausgeführt wird, gilt für den dynamischen Strukturfaktor $S(q, \omega)$ [16, 214]

$$S_M(q, \omega) = \frac{1}{3} (1 + 2j_0(qr\sqrt{3})) \delta(\omega) + \frac{2}{3} (1 - j_0(qr\sqrt{3})) \sum_i \mathcal{L}_i(\omega, \tau_i). \quad (7.7)$$

mit j_0 als der Bessel-Funktion und r , dem Radius der Methylgruppenrotation ($r = 1.2 \text{ \AA}$ [234]).

Der mit SPHERES zugängliche q -Bereich des Spektrometers reicht nicht aus, um die q -Abhängigkeit der Vorfaktoren gemäß dem Dreiplatzsprungmodell zu unterscheiden. Sie werden folglich durch q -abhängige Konstanten $c(q)$ ersetzt und die obige Gleichung vereinfacht sich zu:

$$S_M(q, \omega) = (1 - c(q))\delta(\omega) + c(q) \sum_i \mathcal{L}_i(\omega, \tau_i). \quad (7.8)$$

Nun wird die Verteilung der Energiebarrieren $g(E)$ in das Modell eingefügt:

$$S_M(q, \omega) = (1 - c(q))\delta(\omega) + c(q) \int_0^\infty g(E_i) \mathcal{L}(\omega, \tau(E_i)) dE_i. \quad (7.9)$$

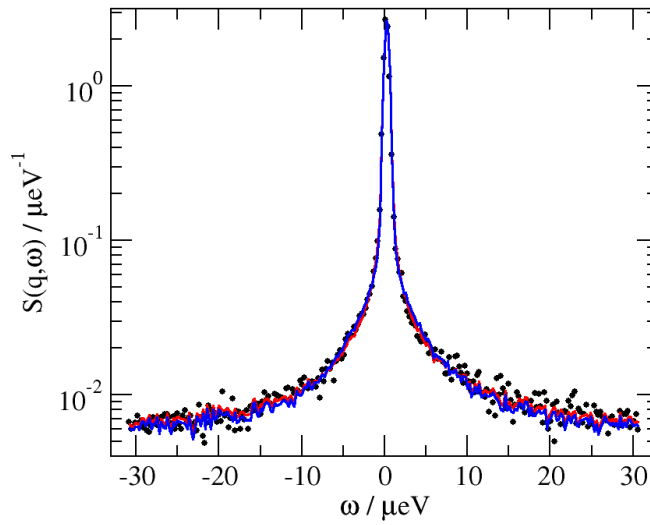


Abb. 7.5: Beispiel eines Fit des Spektrum der Probe ELA_D₂O ($T = 240\text{ K}$, $q = 1.55\text{ \AA}^{-1}$) mit Gleichung (7.9). Rote Linie: Die Parameter aus Tabelle 7.1, grüne Linie: Fit mit Lorentzlinie bei $E_m = 0.167\text{ eV}$.

Um die Gleichungen möglichst einfach zu halten, wurde die Konvolution mit der Auflösungsfunktion nicht in Gleichung (7.9) berücksichtigt. Sie wurde dennoch, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, durchgeführt.

Der Fit des Spektrum bei $q = 1.55\text{ \AA}^{-1}$ für $T = 240\text{ K}$ ist in Abbildung 7.5 als rote Linie zu sehen. Der Verlauf der Daten wird vom Fit gut reproduziert. Zum Vergleich wird das Spektrum nun mit einer einzelnen Lorentzkurve (=Grenzfall $\sigma_E \rightarrow 0$) angepasst. Auch dieser Fit zeigt eine gute Übereinstimmung mit den Spektren, wobei im Energiebereich um $\omega \approx 5\text{ }\mu\text{eV}$ und für $\omega < 20\text{ }\mu\text{eV}$ leichte Abweichungen auftreten. Die Unterschiede sind schwach, aber das Rotationsraten-Verteilungsmodell passt die Daten besser an, und es wird im Folgenden weiter verwendet.

In diesem Abschnitt wurde das Rotationsraten-Verteilungsmodell (RRDM) verwendet, um die inelastische Fensterintensität und die Spektren der Probe ELA_D₂O bei hohen q zu beschreiben. Das Modell liefert eine Parametrisierung, mit der sich die Daten genau beschreiben lassen. Die gefundenen Parameter für $\tau_0 = 10^{-13}\text{ s}$ stimmen sehr gut mit Literaturdaten von anderen Proteinen überein.

Diese Parametrisierung wird nun verwendet, um den dynamischen Prozess des Proteins zu beschreiben und aus dem Probenvergleich die Wasserdynamik zu extrahieren.

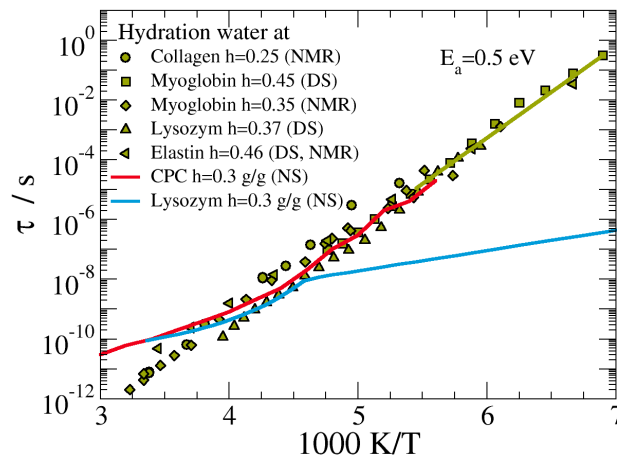


Abb. 7.6: Arrheniusplot der Korrelationszeiten von Hydratationswasser. Zusätzlich zu den NMR Daten aus [89, 174] sind die Messungen an Lysozym von Chen [40] (blaue Linie) und an CPC von Doster [61] (rote Linie) aufgetragen.

7.2 Charakterisierung der Hydratationswasserdynamik

Ziel dieses Abschnitts ist es die Wasserdynamik an Elastin zu charakterisieren und die Ergebnisse vor dem Hintergrund der beiden oben vorgestellten Modelle einzuordnen. Dazu werden die Daten des quasielastischen Scans der zwei verschiedenen hydratisierten Proben verglichen: zum einen Elastin hydratisiert mit H_2O und zum anderen Elastin mit D_2O .

Mit quasielastischer Neutronenstreuung an Proteinen wurden widersprüchliche Aussagen zur Dynamik des Hydratationswassers von Proteinen gefunden: Chen et al. [40] fanden einen Fragil-Stark-Übergang. Doster et al. [61] widersprachen dieser Aussage und schlugen eine andere Datenauswertung vor. Mit dieser Auswertung wird eine Temperaturabhängigkeit der Korrelationszeiten gefunden, die über einen weiten Temperaturbereich mit den in Kapitel 6.3 vorgestellten Daten der NMR-Spektroskopie übereinstimmt.

Die von Chen und Doster erhaltenen Korrelationszeiten sind in Abbildung 7.6 zusammengestellt, ergänzt um die Korrelationszeiten aus der NMR.

Mit Hilfe der Parametrisierung der Methylgruppenbewegung aus dem vorherigen Kapitel wird zunächst der Streubeitrag der Methylgruppen abgetrennt. Das Vorgehen wird im nächsten Abschnitt beschrieben. Der darauf folgende Abschnitt beschreibt einen Ansatz zur Modellierung der Wasserdynamik.

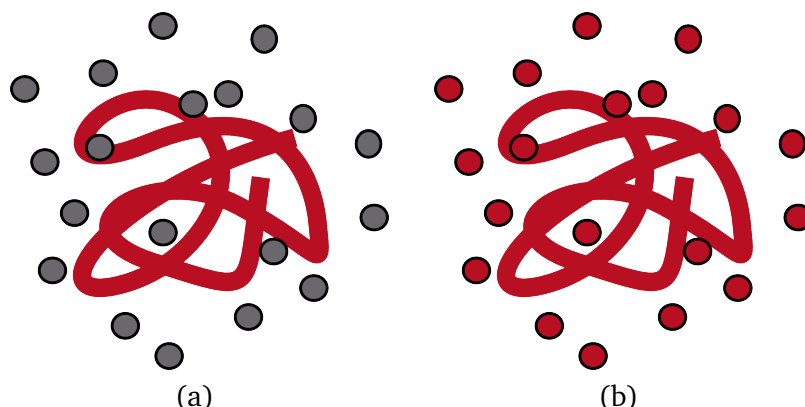


Abb. 7.7: Veranschaulichung des Prinzips Kontrastvariation in der Neutronenstreuung. Deuteronen haben einen geringen Streuquerschnitt, sind in Neutronenstreuexperimenten folglich „ausgegraut“. In dieser Arbeit wurden zwei Proben vermessen (a) ELA_D₂O und (b) ELA_H₂O, deren Sichtbarkeit für Neutronen farblich veranschaulicht ist. Aus dem Unterschied der beiden Proben soll der Streubeitrag des Wassers isoliert werden.

7.2.1 Separation des Streubeitrags von Wasser

Zur Separation des Wasseranteils wird der große Streuquerschnittsunterschied zwischen Protonen und Deuteronen ausgenutzt. Der Beitrag der Deuteronen zur Streuung ist vernachlässigbar gering. Somit ist in der Probe ELA_D₂O nur die Streuung der Proteinprotonen zu sehen. Demgegenüber tragen in der Probe ELA_H₂O sowohl die Protonen im Wasser als auch die Protonen im Protein bei. Abbildung 7.7 veranschaulicht diesen Unterschied.

Der Hydratationsgrad betrug in beiden Proben $h = 0.2 \text{ g/g}$. Nach der Abschätzung in Kapitel 4.3.4 entspricht der Hydratationsgrad von $h = 0.2 \text{ g/g}$ einem Wasser-Protonenanteil an der Gesamtprobe von 23%. Dieser Streubeitrag des Wassers soll in diesem Kapitel isoliert werden.

Um den Beitrag des Wassers sichtbar zu machen, werden zunächst die quasielastischen Spektren beider Proben in Abbildung 7.8(a) verglichen. Darin ist der dynamische Strukturfaktor im Energiebereich $\pm 3 \mu\text{eV}$ für drei q -Vektoren bei $T = 300 \text{ K}$ gezeigt.

Bei kleinen Streuvektoren fällt auf, dass der dynamische Strukturfaktor der mit H₂O hydratisierten Probe (schwarze Punkte) in den Flügeln des Spektrums höhere Intensität aufweist, als die Probe mit D₂O (rote Pluszeichen).

Durch Integration des Energiebereichs von -1.5 bis $-3.0 \mu\text{eV}$ wird, wie oben beschrieben, die inelastische Fensterintensität $IFWI$ gemessen. Diese ist für ausgewählte Streuvektoren in Abbildung 7.8(b)) gezeigt.

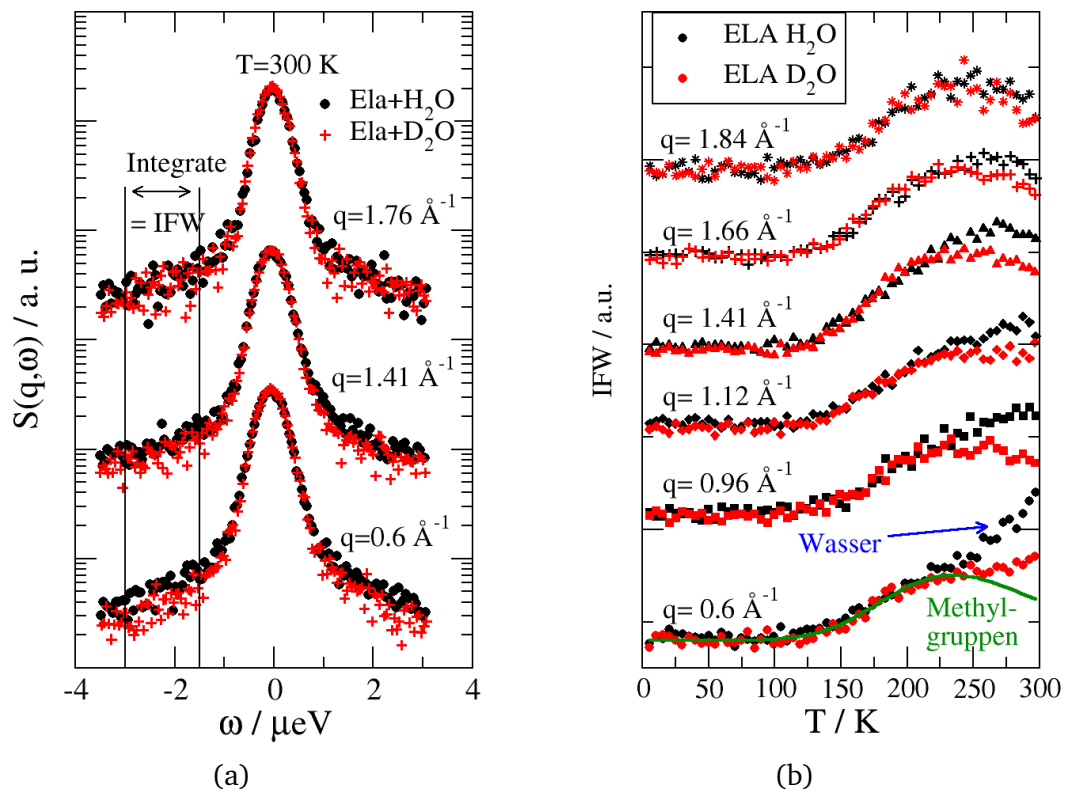


Abb. 7.8: a) Quasielastische Spektren der Proben ELA_D2O (rote +) und ELA_H2O (schwarze Punkte) für verschiedene Streuvektoren im Vergleich. b) Inelastische Fensterintensität der beiden Proben.

Der Temperaturverlauf der *IWFI* stimmt in beiden Proben für große Streuvektoren überein. Dieser dynamische Prozess wurde im vorangegangenen Kapitel der Methylgruppenbewegung zugeordnet und mittels des RRDM-Modells parametrisiert.

Für $q < 1.55 \text{ \AA}^{-1}$ wird bei hohen Temperaturen ein Unterschied zwischen den beiden Proben beobachtet. Die Probe mit H_2O weist eine stärkere Streuung auf. Der zusätzliche Streubeitrag hängt vom Streuvektor ab: sein Maximum verschiebt sich für kleinere q -Vektoren zu größeren Temperaturen. Folglich ist dieser Beitrag als nichtlokaler Beitrag identifizierbar. Da er in der Probe ELA_ H_2O deutlich stärker ausgeprägt ist, wird er auf die Streuung des Wassers zurückgeführt. Der Streubeitrag des Wassers kann in den inelastischen Fenstermessungen somit sichtbar gemacht werden.

Ein Streubeitrag mit derselben q -Abhängigkeit wird auch in Probe ELA_ D_2O gefunden. Seine Intensität ist jedoch geringer. Versuchsweise wird dieser Prozess nun ebenfalls dem Wasser zugeordnet. Dass ein Streubeitrag des Wassers in der Probe mit D_2O gefunden werden kann, ist auf den Austausch von Protonen zwischen Wasser und Protein zurückzuführen. Dieser Anteil wird in der Abschätzung der austauschbaren Protonen in Kapitel 4.3.4 auf maximal 10% der Protonen geschätzt.

Die gesamte inelastische Fensterintensität lässt sich folglich als Summe des Methylanteils und des Wasseranteils beschreiben:

$$IWFI(T) = IWFI_{\text{Methyl}} + IWFI_{\text{Wasser}} + b. \quad (7.10)$$

Der Streubeitrag der Methylgruppen $IWFI_{\text{Methyl}}$ ist aus Kapitel 7.1.1 bereits bekannt. Die temperaturabhängige inelastische Fensterintensität wurde nun mit den Parametern aus Tabelle 7.1 und freiem Amplituden- und Hintergrundparametern A_1 und b angepasst. Der Fit zur Bestimmung der Methylgruppenparameter wurde auf den Temperaturbereich 4-250 K eingeschränkt, um die Amplitude der Methylgruppen nicht durch den Einfluss des Wassers zu überschätzen. Ein Beispielfit der Daten ist in Abbildung 7.8(b) für $q = 0.6 \text{ \AA}^{-1}$ als grüne Linie gezeigt.

Die Fitfunktionen werden nun von den Daten subtrahiert, um den Wasseranteil zu extrahieren. Der Wasseranteil ist in Abbildung 7.9 für beide Proben dargestellt.

Im nächsten Schritt sollen diese Daten mit einem Modell für Wasserdynamik angepasst werden.

7.2.2 Ansätze zur Modellierung der Wasserdynamik

Mit Hilfe der Parametrisierung der Methylgruppendynamik in Kapitel 7.1.1 konnten der Wasserbeitrag und der Proteinbeitrag voneinander getrennt werden. Der Wasserbeitrag ist in Abbildung 7.9 aufgetragen.

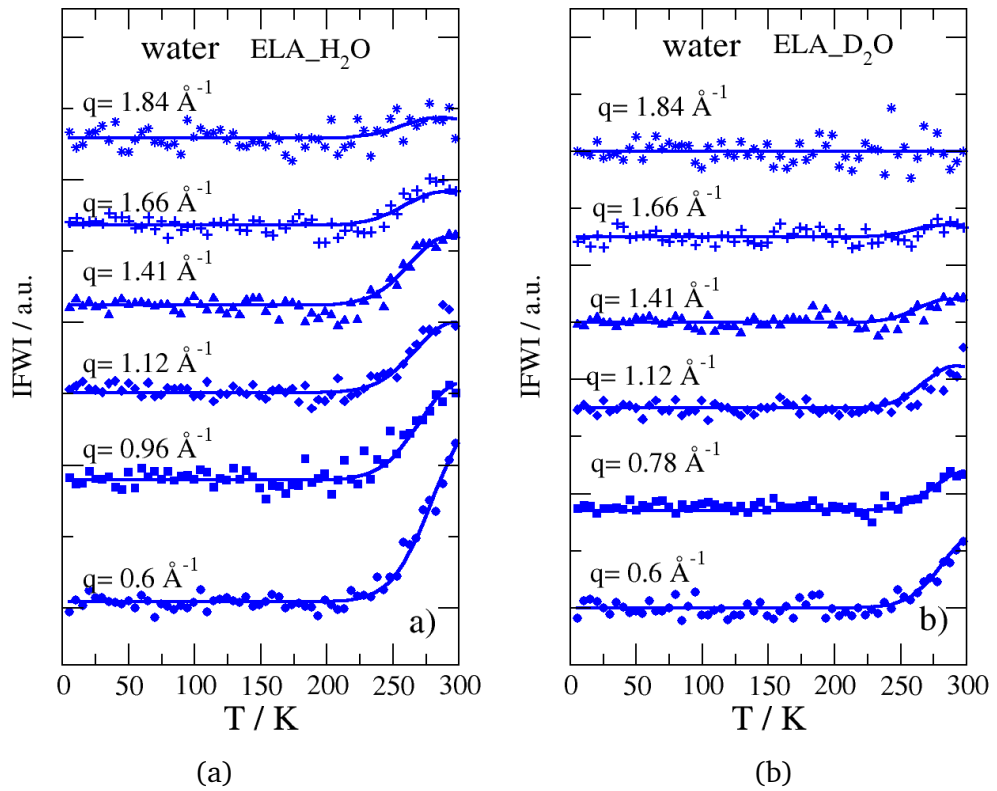


Abb. 7.9: Inelastische Fensterintensität des Wassers nach Abziehen der Methylgruppenbeiträge für a) Probe ELA_H2O und b) Probe ELA_D2O. Die durchgezogenen Linien sind Fits mit der Gleichung (7.13) mit $E_m = 0.63 \text{ eV}$ und $\sigma_E = 0.05 \text{ eV}$.

Bei der Betrachtung der Abhängigkeit vom Streuvektor fällt auf, dass sich das Maximum der IFWI mit steigendem q zu niedrigeren Temperaturen verschiebt. Dies ist eine Signatur von diffusiver Bewegung [82, 101, 260]. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Intensität des Wasserbeitrags mit steigendem q abnimmt. Diese Streuvektorabhängigkeit der Intensität ist im Modell der Diffusion nicht vorgesehen. Es ist bisher nicht gelungen eine plausible Erklärung für diese Beobachtung zu finden. Im Anhang A.6 wird eine detailliertere Untersuchung möglicher Gründe für eine q -abhängige Intensität durchgeführt und erläutert, weshalb die betrachteten Gründe die Beobachtung nicht erklären können.

Zur Beschreibung der Wasserdynamik wird nun auf die Ergebnisse der Untersuchung von Wasserdynamik mit NMR in Kap. 6.3 zurückgegriffen. Für verschiedene Proteine lässt sich die Wasserdynamik mit einer Verteilung von Aktivierungsenergien und einer Arrhenius-Temperaturabhängigkeit beschreiben [89, 174] .

Nun muss noch eine Parametrisierung der Streuvektorabhängigkeit gefunden werden. Hierfür wird als einfachster Fall, das Modell für langreichweitige Diffusion angenommen und die Korrelationszeit über:

$$\tau = \frac{1}{Kq^2} \quad (7.11)$$

in den Diffusionskoeffizienten K umgerechnet. Dieses Modell ist im Allgemeinen ein Modell heterogener Dynamik, d.h. es liegt eine Verteilung von Zeit- und Diffusionskonstanten vor und ein Wassermolekül kann zwischen schneller und langsamer Dynamik wechseln. Statt der Diffusionskonstanten D muss im Allgemeinen ihr Mittelwert, also das Ratenmittel, betrachtet werden:

$$\langle K \rangle \propto \left\langle \frac{1}{\tau} \right\rangle \neq \frac{1}{\langle \tau \rangle}. \quad (7.12)$$

Das Ratenmittel ist jedoch ungleich dem inversen der mittleren Zeitkonstante $\frac{1}{\langle \tau \rangle}$. Die hier betrachteten Streuvektoren sind relativ groß. Es werden somit Bewegungen betrachtet, die nur 1-2 Sprünge⁸ umfassen. Auf dieser Längenskala und der damit verbundenen Zeitskala gibt es jedoch noch keinen Austausch der Sprungraten eines Moleküls. Nur unter dieser Annahme kann Gleichung 7.11 verwendet werden.

Das Modell für die inelastische Fensterintensität von Wasser lautet somit:

$$IFWI(q, T) = b + A_1 \int_{-\infty}^{\infty} g(\ln K) \frac{(K(T)q^2)^{-1}}{1 + (K(T)q^2)^{-2} \omega_{\text{fix}}^2} d \ln K. \quad (7.13)$$

Die IFWI-Daten werden nun mit diesem Modell gefittet. Dabei wird der Parameter τ_0 auf den zuvor in NMR-Experimenten ermittelten Wert von $\tau_0 = 1 \cdot 10^{-19}$ s festgesetzt [173]. Dieser Wert erscheint unphysikalisch klein. Er wurde dennoch verwendet,

⁸ Wobei unter einem „Sprung“ die Bewegung des Schwerpunkts des Wassermoleküls um den mittleren intermolekularen Abstand (=0.27 nm) verstanden wird.

denn die Analyse der Fitparameter als Funktion von τ_0 in Abschnitt 7.1.2 zeigt, dass nur mittels dieser Festlegung Werte aus verschiedenen Experimenten verglichen werden können. Der Mittelwert der Energiebarrierenverteilung E_m und die Breite σ_E sind globale Fitparameter für alle Streuvektoren.

Die Fits sind als durchgezogene Linien für Probe ELA_H₂O in Abbildung 7.9(a) eingetragen. Sie passen die Beiträge des Wassers über alle q -Vektoren gut an. Die Fitparameter sind in Tabelle mit den Fitparametern in [173] verglichen. Die Aktivierungsenergie ergibt sich zu $E_A = 0.63$ eV, die Breite der Energiebarrierenverteilung wird zu $\sigma_E = 0.050$ eV bestimmt. In der Arbeit von Lusceac et al. [173] wurden $E_A = 0.55$ eV und $\sigma_E = 0.043$ eV gefunden.

Tab. 7.3.: Fitparameter aus Messungen des Hydratationswassers an Elastin

Methode	E_m /eV	σ_E / eV	Protein
Neutronenstreuung	0.63	0.050	Elastin $h = 0.2$ g/g
NMR + DS [173]	0.55	0.043	Elastin $h = 0.43$ g/g

Das Maximum der IFWI des diffusiven Prozesses liegt bei kleinen q -Vektoren außerhalb des Messbereichs (vgl. Abb. 7.9). Der Wert der Aktivierungsenergie wird durch Anpassung des Maximums in den IFWI für große Streuvektoren ($q > 1.41 \text{ \AA}^{-1}$) festgelegt. Bei großen Streuvektoren ist allerdings die Intensität des Prozesses am niedrigsten. Die gewonnene Aktivierungsenergie ist somit mit einer größeren Unsicherheit behaftet. Messungen bei höherer Temperatur (bis $T = 325$ K, da oberhalb das Protein mobil wird) können helfen, diese Unsicherheit beizulegen.

Die Aktivierungsenergien E_A der Neutronenstreuexperimente liegen etwas über jenen, die zuvor mit dielektrischer Spektroskopie und NMR an Proteinhydratationswasser bestimmt wurden. Dies kann durch den im Vergleich zu den anderen Proben geringeren Hydratationsgrad verursacht sein. Die Abnahme des Hydratationsgrades führte in vorangegangenen Experimenten zu einem starken Anstieg τ und damit von τ_0 [89, 136].

Für die Probe ELA_D₂O im Wasser ist der Fit mit Gleichung (7.13) bei freiem E_m und σ_E nicht eindeutig möglich, da in den Rohdaten ein ausgeprägtes Maximum fehlt. Die eingezeichnete Linie zeigt die Anpassung der Messdaten unter Fixierung der in der Probe ELA_H₂O gewonnenen mittleren Energie und der Verteilungsbreite. Mit diesen Werten lassen sich die Daten gut beschreiben. Somit ist die Annahme gerechtfertigt, dass es sich bei diesem Beitrag ebenfalls um einen Wasserprozess handelt.

Die Wasserdaten können im gesamten Temperaturbereich mit einer Arrhenius-Temperaturabhängigkeit gefittet werden. Um beurteilen zu können, inwiefern diese Beobachtung aussagekräftig zur Unterscheidung der beiden Modelle für Wasserdynamik von Chen und Doster sind, wurde die inelastische Fensterintensität für das Modell von Chen berechnet. Sie ist in Abbildung 7.10 gezeigt. Gekennzeichnet wird die inelas-

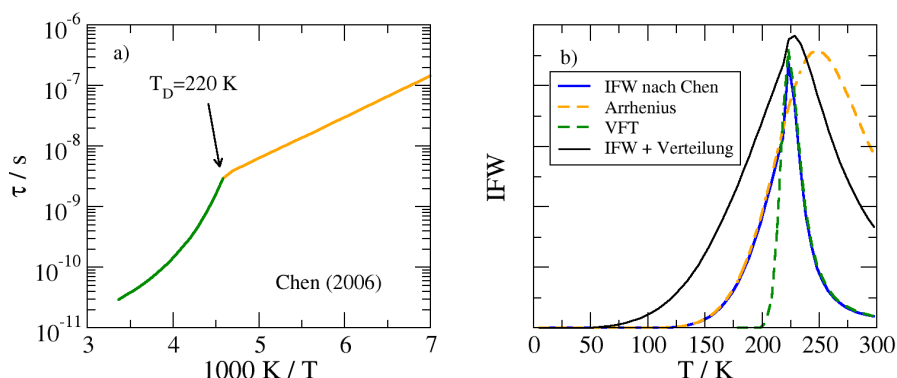


Abb. 7.10: a) Korrelationszeiten für Hydrationswasser an Lysozym nach Chen [40]. b) Nach Gleichung (7.4) berechnete inelastische Fensterintensität für die nebenstehende Korrelationszeiten. Der Arrheniusanteil und der Vogel-Fulcher-Anteil sind zusätzlich separat aufgetragen. Darüber hinaus zeigt die schwarze Linie den Einfluss einer Verteilung von Korrelationszeiten auf die nach Chen vorhergesagte inelastische Fensterintensität.

tische Fensterintensität durch einen steilen Abfall bei hohen Temperaturen, wenn die Temperaturabhängigkeit von stark zu fragil übergeht. Diese Signatur ist in den Daten nicht zu erkennen.

Wie kann der Befund, dass die Daten des Hydrationswassers sich nicht mit dem Modell von Chen anpassen lassen, erklärt werden? Entweder, Wasser an Elastin verhält sich anders als das Wasser in Lysozym, oder das Vorliegen eines Fragil-Stark-Übergangs muss in Zweifel gezogen werden. Die Vermutung, dass das Verhalten des Hydrationswassers von der Art des Proteins abhängt ist recht unwahrscheinlich. Zum einen wird von Chen et al. selbst angenommen, dass der Fragil-Stark-Übergang eine Bulk-eigenschaft des Wassers, also eine proteinunabhängige Eigenschaft ist, zum anderen stimmen die von Khodadadi et al. [136] bestimmten Korrelationszeiten des Hydrationswassers an Lysozym gut mit den Korrelationszeiten des Hydrationswassers an anderen Proteinen überein (vgl. Abb. 7.6). Gegen einen Fragil-Stark-Übergang im Hydrationswasser spricht darüber hinaus auch die Auswertung der Neutronenstreu-daten von Doster. Die vorliegende qualitative Abweichung ist somit in Übereinstimmung mit der Kritik am vorgeschlagenen Fragil-Stark-Übergang [59, 225, 270].

Zusammenfassend lassen sich die inelastischen Fensterscans für Hydrationswasser an Elastin in guter Übereinstimmung mit den NMR-Daten als dynamischer Prozess mit einer Arrhenius-Temperaturabhängigkeit beschreiben. Es werden keine Anzeichen für einen Fragil-Stark-Übergang gefunden.

7.3 Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Kapitel wurden die Protein- und Wasserdynamik des ungeordneten Proteins Elastin mit quasielastischer Neutronenstreuung untersucht.

Die experimentellen Ergebnisse zeigen, dass in den Proben mindestens zwei Streubeiträge existieren. Einen Beitrag liefert die Dynamik des Proteins, der andere stammt vom Wasser. Der Proteinprozess ist ein q -unabhängiger, lokaler Prozess, der bei tiefen Temperaturen $T \approx 120$ K einsetzt. Dieser wird den Methylgruppen zugeordnet.

Zur Analyse der Protein- und Wasserdynamik wurde die inelastische Fensterintensität aus quasielastischen Temperaturscans gewonnen. Sie erwies sich als besonders nützlich, denn sie erlaubt eine Charakterisierung der Dynamik über den gesamten Temperaturbereich. Diese Methode, obwohl seit langem bekannt [101], hat erst kürzlich Anwendung bei der Untersuchung von Proteindynamik gefunden [82, 256] und wurde zur Charakterisierung von Wasserdynamik bisher nach Wissen des Autors nicht eingesetzt.

Zur quantitativen Auswertung der Methylgruppendiffusionsdynamik wurde das Rotationsraten-Verteilungsmodell herangezogen. Es beschreibt die Methylgruppenbewegung als Dreiplatzsprung, wobei durch die unterschiedlichen Positionen der Methylgruppen im Proteinmolekül eine Verteilung von Raten vorliegt. Unter Festlegung der Versuchsfrequenz können die Daten mit diesem Modell sehr gut gefittet werden und es ergeben sich die Werte $E_a = 0.17$ eV für die Aktivierungsenergie und $\sigma_E = 0.04$ eV für die Breite der Verteilung, die mit Literaturwerten übereinstimmen [221, 234, 256].

Das mittlere Verschiebungsquadrat steigt linear mit der Temperatur an. Es ist keine Abweichung von der Linearität erkennbar und somit ist keine Signatur des Einsetzens eines zweiten Prozesses vorhanden. Das heißt, in Elastin gibt es bei $h \leq 0.4$ g/g keinen dynamischen Übergang im Temperaturbereich $T < 300$ K. Abgesehen von der Methylgruppenbewegung ist Elastin demnach in diesem Parameterbereich immobil. Dieses Ergebnis ist in Einklang mit Messungen der kalorimetrischen Glasübergangstemperatur an Elastin in Abhängigkeit vom Hydratationsgrad [229] und den Ansichten zum dynamischen Übergang z.B. von Doster und Ngai [60, 195], dass der Glasübergang mit dem dynamischen Übergang in Proteinen verknüpft ist. Der genaue Zusammenhang von dynamischem Übergang und Glasübergang ist in der Literatur, wie in Kap. 2.3 geschildert, noch umstritten.

Durch die Interpretation der Proteindynamik als lokale Methylgruppenbewegung ist die Grundlage der Auswertung des mittleren Verschiebungsquadrats, die gaußsche Näherung, nicht mehr erfüllt. Der lokale Dreiplatzsprung liefert einen Beitrag zur elastischen Streuung, dessen Intensität, nicht aber dessen Breite q -abhängig ist (vgl. Gl. (7.7)) [16]. Die Intensität variiert im untersuchten Streuvektorbereich nur um etwa den Faktor 2 und durchläuft ein Maximum (vgl. Abb. A.6(a) in Kap. A.6). Die Gaußnäherung nimmt jedoch an, dass der Abfall aufgrund eines q^2 -abhängigen Prozess erfolgt. Wird das MSD mit dieser Annahme ausgewertet, so ist der Effekt ähnlich dem von Mehrfachstreuung: das mittlere Verschiebungsquadrat wird unterschätzt [288]. Wenngleich der Zahlenwert des berechneten MSD nicht zuverlässig ist, wird der qualitative Verlauf des MSD nicht beeinflusst. Die Interpretation, dass der Anstieg lediglich

durch die Methylgruppenbewegung verursacht wird, ist weiterhin gültig. Dies wird auch durch die Daten der elastischen Intensität bestätigt.

Unsere Daten zeigen, dass der Hauptbeitrag der quasielastischen Streuung von den Methylgruppen des Proteins verursacht wird, obwohl deren Anteil nur bei ca. 30% liegt. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Neutronenstreuexperimenten an den Proteinen Apoferritin, Myoglobin und Lysozym [222, 234, 256].

Das Ergebnis der Auswertung der Methylgruppendynamik ist demnach gut in die Literatur eingebunden. Nun werden die Ergebnisse zur Wasserdynamik zusammengefasst und diskutiert.

Um den Streubeitrag des Wassers zu isolieren, wurden zwei Konzepte ausgenutzt. Zum einen wurde durch Kontrastvariation in einer Probe die Streuung des Wassers weitgehend unterdrückt und in einer anderen sichtbar gelassen. Zum anderen wurde die Erkenntnis aus der Auswertung der Proteindynamik verwendet, dass Elastin im untersuchten Temperaturbereich abgesehen von der Methylgruppenrotation immobil ist. Der zusätzliche Streubeitrag der Proben konnte somit auf das Wasser zurückgeführt werden.

Um die Wasserdynamik zu beschreiben wurde das auf das Ergebnis der Untersuchung von Wasserdynamik an Proteinen mit NMR und DS [89, 173] zurückgegriffen. In diesen Studien wurde für Wasser eine Gaußverteilung von Aktivierungsenergiebarrieren gefunden. Der q -Abhängigkeit wurde durch die einfache Annahme dreidimensionaler Diffusion Rechnung getragen.

Der Fit der inelastischen Fensterintensität des Hydrationswassers an Elastin mit einer Verteilung von Aktivierungsenergiebarrieren unter Annahme einer Arrhenius-Temperaturabhängigkeit ergibt die Werte $E_a = 0.63$ eV und $\sigma_E = 0.05$ eV. Sie stimmen gut mit den Werten überein, die zuvor für die Energiebarrierenverteilung des Hydrationswassers an verschiedenen Proteinen mit NMR-Spektroskopie und DS gewonnen wurden.

Die Analyse der Wasserdaten bleibt jedoch aus zwei Gründen vorläufig. (1) Das Maximum in der inelastischen Fensterintensität liegt nur für die Kurven bei großem q im Temperaturbereich und diese Kurven sind aufgrund der mit q sinkenden Intensität des Prozesses am stärksten verrauscht. (2) Der Grund für die sinkende Intensität der IWFI konnte bislang nicht geklärt werden.

Eine Erweiterung des Temperatur- und Streuvektorbereichs in zukünftigen Messungen könnte eine bessere Festlegung der Parameter erlauben, problematisch bleibt jedoch die Abhängigkeit der Fitparameter E_a , σ_E und τ_0 voneinander. Interessant wäre eine Messung zu höheren Temperaturen darüber hinaus um festzustellen, ob beim kalorimetrischen Glasübergang das Einsetzen eines weiteren Protein- oder Wasserprozesses identifizierbar ist, was auf eine Verknüpfung des Glasübergangs und des dynamischen Übergangs schließen ließe.

Bei der Beschreibung der Wasserdynamik konnten keine Hinweise auf den von Chen et al. [40] vorgeschlagenen Fragil-Stark-Übergang gefunden werden. Das Einsetzen der von Chen gefundenen temperaturabhängigen Korrelationszeiten $\tau(T)$ zur Berechnung der IFWI ergibt einen qualitativ anderen Verlauf des IFWI. Es ist jedoch zu beachten, dass die Untersuchungen von Chen et al. für das Hydratationswasser des Lysozyms ausgeführt wurden, während die hier vorgestellten Daten sich auf das Protein Elastin beziehen. Wenngleich die vorgelegten Hinweise aufgrund des begrenzten Temperaturbereichs ein Ausschließen des FST nicht mit letzter Gewissheit zulassen, stimmen sie doch mit der Interpretation aus anderen Publikationen überein [59,225,270] und passen somit in das Gesamtbild.

Bei der Auswertung und Diskussion der Ergebnisse der Messungen von Elastin mit Neutronenstreuung wurde wiederholt auf Erkenntnisse aus der NMR zurückgegriffen. Die dabei erzielte Übereinstimmung zeigt, dass Neutronenstreuung und NMR einander sehr gut ergänzen.

Im folgenden Kapitel wird nun anhand verschiedener Beispiele aufgeführt, wie die verschiedenen in dieser Arbeit eingesetzten Methoden NMR, Neutronenstreuung und MD-Simulationen zusammengebracht werden können.

8 Vergleichende Diskussion

Diese Arbeit vereint Untersuchungen mit drei Methoden. Die Ergebnisse der MD-Simulationen sind in Kapitel 5 vorgestellt, in Kapitel 6 wurde die Untersuchung der Dynamik des vollständig deuterierten CPC mit ^2H -NMR-Spektroskopie präsentiert und in Kapitel 7 die Messungen von Protein- und Wasserdynamik mit Neutronenstreuung. In diesem Kapitel sollen die Ergebnisse aus diesen verschiedenen Methoden nun gegenüber gestellt werden, um ein umfassendes Bild der Proteindynamik zu gewinnen.

Zunächst werden die Ergebnisse der drei Methoden zur Proteindynamik miteinander verglichen. Anschließend wird ein solcher Vergleich für die Dynamik des Hydratationswassers vorgenommen. Im letzten Abschnitt wird das Bild vorgestellt, das die Ergebnisse der verschiedenen Methoden liefern und dieses Bild wird im Zusammenhang mit verschiedenen Modellen des dynamischen Übergangs diskutiert.

8.1 Vergleich der Ergebnisse zur Proteindynamik

Der Ergebnisvergleich bezüglich der Proteindynamik gliedert sich in zwei Teile. Der erste fasst die Ergebnisse zur Methylgruppenbewegung zusammen, der zweite stellt die Ergebnisse zur Rückgratbewegung vor.

8.1.1 Methylgruppenbewegung

Die Methylgruppen-Dynamik wurde in dieser Arbeit vorrangig in den Neutronenstreuungen an Elastin charakterisiert. Die Methylgruppenbewegung ist eine schnelle Dreiplatzsprungbewegung [44]. Im Protein liegt durch die unterschiedlichen lokalen Umgebungen der verschiedenen Methylgruppen eine Verteilung von Energiebarrieren vor. Das Rotationsraten-Verteilungsmodell trägt dieser Verteilung Rechnung und nimmt eine Gaußverteilung der Energiebarrieren an.

Dieses Modell wurde zur Analyse der Neutronenstreudaten verwendet und die Verteilung der Energiebarrieren wurde in Übereinstimmung mit Literaturdaten [221, 256] zu $E_a = 0.17 \text{ eV}$ und $\sigma_E = 0.04 \text{ eV}$ (vgl. Tab 7.1) bei Annahme einer Versuchsfrequenz von $\tau_0 = 10^{-13} \text{ s}$ [101] bestimmt.

Aus den MD-Simulationen mit All-Atom Kraftfeld (8ELA-AA) kann das MSD der Methylgruppen-Protonen separat berechnet werden. Die Charakteristik des Dreiplatzsprunges wird in den Trajektorien bei geeigneter Projektion der Bewegung erkennbar. Ein Beispiel einer typischen Methylgruppentrajektorie ist in Abbildung 5.10(c) gezeigt.

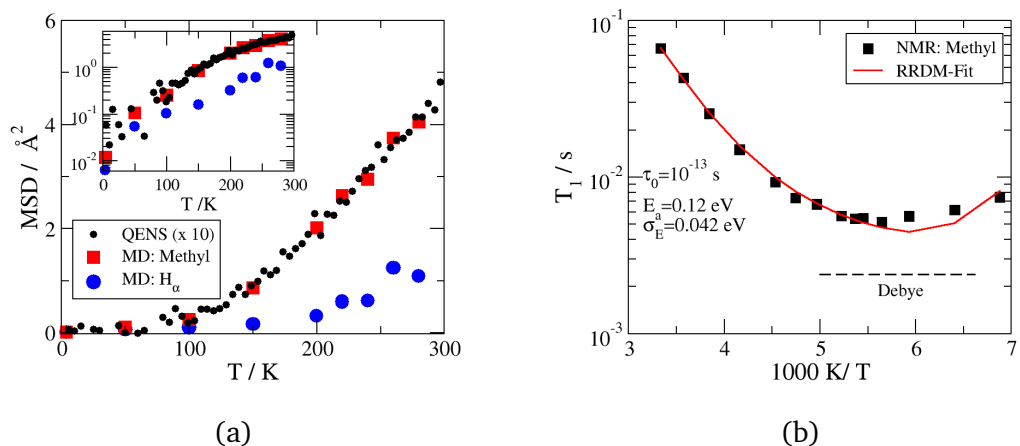


Abb. 8.1: a) Mittleres Verschiebungsquadrat für Rückgrat-Protonen und Methylgruppen-Protonen im Zeitintervall von 2 ns. b) T_1 -Daten aus Abb. 6.4 und Fit der Daten mit dem Rotationsraten-Verteilungsmodell.

Zum Vergleich der Neutronenstreudaten mit den Simulationsdaten kann das mittlere Verschiebungsquadrat (bei 2 ns) verwendet werden. Das MSD aus den Neutronenstreumessungen und aus den MD-Simulationen unterscheiden sich um etwa eine Größenordnung. Unterschiede dieser Größe wurden im Laufe der Arbeit bereits beim Vergleich verschiedener Auswertemethoden von Neutronenstreudaten (vgl. Abb. 2.8 und Fußnote 16) und beim Vergleich von MD-Simulationen mit NMR-Messungen (vgl. Abb. 5.15(b)) gefunden. Um den qualitativen Vergleich der Methoden zu ermöglichen wurde das MSD aus der Neutronenstreuung in Abbildung 8.1(a) mit dem Faktor 10 multipliziert. Nach dieser Korrektur stimmt das MSD der Methylgruppen aus den MD-Simulationen hervorragend mit dem MSD aus den Neutronenstreumessungen überein, der Temperaturverlauf wird genau nachgebildet. Die sehr gute Übereinstimmung bis hinunter zu tiefen Temperaturen wird durch die semilogarithmische Auftragung der Daten im Inset unterstrichen.

Das MSD der am Proteinerückgrat sitzenden H_α-Protonen aus MD-Simulationen zeigt hingegen einen qualitativ anderen Verlauf. Die Rückgratprotonen weisen ein geringeres MSD auf als die Methylgruppenprotonen. Die Daten der Neutronenstreuung können den Verlauf des MSD der Rückgratprotonen auch unter Annahme eines anderen Korrekturfaktors nicht abbilden.

Aufgrund der räumlich eingeschränkten Dreiplatzsprungbewegung ist für eine einzelne Methylgruppe bei hohen Temperaturen oder langen Zeiten zu erwarten, dass ein Plateauwert des MSD erreicht wird. In der semilogarithmischen Darstellung im Inset wird diese Tendenz deutlich. Im Protein liegt eine Verteilung von Zeitkonstanten für die Reorientierung vor ($\sigma_E = 0.04$ eV). Im betrachteten Zeitintervall nehmen mit steigender Temperatur zunehmend mehr Methylgruppen an der Reorientierung teil. Der

Plateauwert wird infolgedessen erst bei hohen Temperaturen außerhalb des Messbereichs erreicht.

Auch in den ^2H -NMR-Untersuchungen des vollständig deuterierten CPC in Kapitel 6 konnten Methylgruppenbewegung und Rückgratbewegung separiert werden. Ein erster Vergleich zwischen Neutronenstreuung und NMR-Spektroskopie wurde in Tabelle 7.2 für das erwartete T_1 -Minimum vorgenommen. Zwischen Vorhersage aus quasielastischer Neutronenstreuung und beobachtetem Minimum liegt eine Abweichung von ca. 20 K. Zum genaueren Vergleich können die Parameter der Energiebarrierenverteilung aus den Spin-Gitter-Relaxationszeiten gewonnen werden. Abbildung 8.1(b) zeigt T_1 der Methylgruppen aus Abbildung 6.4 als Funktion der inversen Temperatur. Die Methylgruppen weisen ein breites T_1 -Minimum auf, dessen minimaler Wert deutlich über dem Debye-Minimum von 2.4 ms liegt. Auch zur Interpretation der ^2H -NMR-Daten der Methylgruppen muss demnach eine Verteilung von Korrelationszeiten herangezogen werden.

Es wurde ein Fit mit einer log-Gauß-Verteilung von Korrelationszeiten, die dem Rotationsraten-Verteilungsmodell entspricht, vorgenommen. Der Fit mit dem Rotationsraten-Verteilungsmodell ergibt eine Aktivierungsenergie von $E_a = 0.12$ eV und eine Breite von $\sigma_E = 0.04$ eV bei einer vorgegebenen Versuchsfrequenz von $\tau_0 = 10^{-13}$ s. Die mittlere Aktivierungsenergie ist somit etwas niedriger als der mit Neutronenstreuung gefundene Wert von $E_a = 0.17$ eV, aber immer noch in einem Bereich guter Übereinstimmung. Die Anpassung der T_1 -Werte ist bei hohen Temperaturen gut, bei tiefen Temperaturen werden aber Abweichungen deutlich. Diese können möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass bei tiefen Temperaturen keine exponentielle Relaxation mehr beobachtet wird, wie dem Streckungsparameter im Inset in Abb. 6.4 zu entnehmen ist.

Auch aus den MD-Simulationen konnte die Aktivierungsenergie aus den Korrelationszeiten $\tau_{1/e}$ der intermediären inkohärenten Streufunktion der Methylgruppenprotonen gewonnen werden (nicht gezeigt). Sie stimmt mit $E_a = 0.185$ eV bei einer Versuchsfrequenz von $\tau_0 = 10^{-15}$ s gut mit den Werten der Neutronenstreuung und den Literaturwerten überein.

In der Untersuchung des CPC mit ^2H -NMR-Spektroskopie für verschiedene Hydratationsgrade wird gefunden, dass der Methylgruppenbeitrag vom Hydratationsgrad unabhängig ist (vgl. Abb. 6.7). Dies wird in den Neutronenstreudaten (vgl. Abb. 7.1) bestätigt und steht in Übereinstimmung mit Beobachtungen von hydratationsgrad-unabhängiger Methylgruppendiffusionsdynamik in der Literatur [221, 277].

Zwischen Neutronenstreuung und MD-Simulationen gibt es somit hinsichtlich der Methylgruppendiffusionsdynamik quantitative Unterschiede, qualitativ stimmen die Ergebnisse der Methoden jedoch bemerkenswert gut überein. Sowohl die Neutronenstreuungsergebnisse, als auch die ^2H -NMR-Daten lassen sich mit dem Rotationsraten-Verteilungsmodell

anpassen. Die gefundene Breite der Verteilung stimmt gut überein, für die mittlere Aktivierungsenergie ergibt sich eine kleine Abweichung.

8.1.2 Rückgratbewegung

Die Rückgratbewegung wurde experimentell mit ^2H -NMR-Spektroskopie im Protein Cyano-Phycocyanin untersucht. In diesen Messungen wurde mit Erwärmen das Einsetzen einer kleinamplitudigen Rückgratbewegung gefunden (vgl. Kap. 6). Dieser Befund soll nun mit den Ergebnissen der MD-Simulationen verglichen werden.

In den mittels MD-Simulationen gewonnenen Korrelationsfunktionen des Proteinrückgrates wird ein anomaler Abfall beobachtet (vgl. Kap. 5). In Abbildung 8.2(a) ist die aus den MD-Simulationen nach Gleichung (3.83) berechnete Orientierungskorrelationsfunktion F_2 der C=O-Bindung (Rückgratbewegung) für verschiedene Temperaturen gezeigt. Die durchgezogenen Linien stammen aus der Auswertung der um Rotation und Translation des Gesamtmoleküls korrigierten Trajektorien. Für $T = 310\text{ K}$ und $T = 200\text{ K}$ sind als gestrichelte Linien die nicht-korrigierten Orientierungskorrelationsfunktionen eingezeichnet. Der anomale Abfall dominiert im relevanten Zeitbereich. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Steigung für abnehmende Temperaturen immer flacher wird und für $T \approx 200\text{ K}$ verschwindet. In Abbildung 8.2(b) ist der Korrelationsverlust $\Delta F_2 = F_2(t = 1\text{ ps}) - F_2(t = 1\text{ ns})$ sowohl für die Simulationen in Elastin als auch in Myoglobin aufgetragen. Mit dieser Größe kann veranschaulicht werden, dass der Korrelationsverlust im Zeitintervall geringer wird und bei $T = 200\text{ K}$ fast verschwindet.

In der Analyse der MD-Simulationen ließ sich dieses Verhalten gut mit dem fraktionalen Ornstein-Uhlenbeck-Prozess, also einem diffusiven Prozess innerhalb eines rauen harmonischen Potentials, beschreiben. Die Abnahme des Korrelationsabfalls zu tiefen Temperaturen hin, wird in diesem Bild durch geringere Auslenkung der Teilchen im Potential gemäß Boltzmann, und infolgedessen geringere Positionsfluktuationen der Atome verursacht. Eine solche Reduktion der Bewegungsamplitude wurde auch in den ^2H -NMR-Messungen beobachtet. In beiden Fällen ist der Korrelationsabfall durch die beobachtete Bewegung klein und die Amplitude des Bewegungsprozesses geht für $T < 200\text{ K}$ gegen Null. Der mit ^2H -NMR-Spektroskopie gemessene kleinamplitudige Rückgratprozess des Proteins weist demnach ähnliche Eigenschaften auf, wie der in den MD-Simulationen beobachtete Prozess. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei beiden Beobachtungen, um denselben Prozess handeln könnte.

Diese Annahme soll nun mittels Random-Walk-Simulationen getestet werden. Wenn der anomale Abfall die Ursache der Verschmälerung der ^2H -NMR-Spektren darstellt, lassen sich die MD-Trajektorien und die NMR-Ergebnisse mittels Random-Walk-Simulationen zusammenbringen. Statt eines zufallsbasierten Sprungmodells, können die Rotationstrajektorien der MD-Simulationen direkt die Grundlage zur Berechnung des NMR-Signals liefern. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die MD-Trajektorien

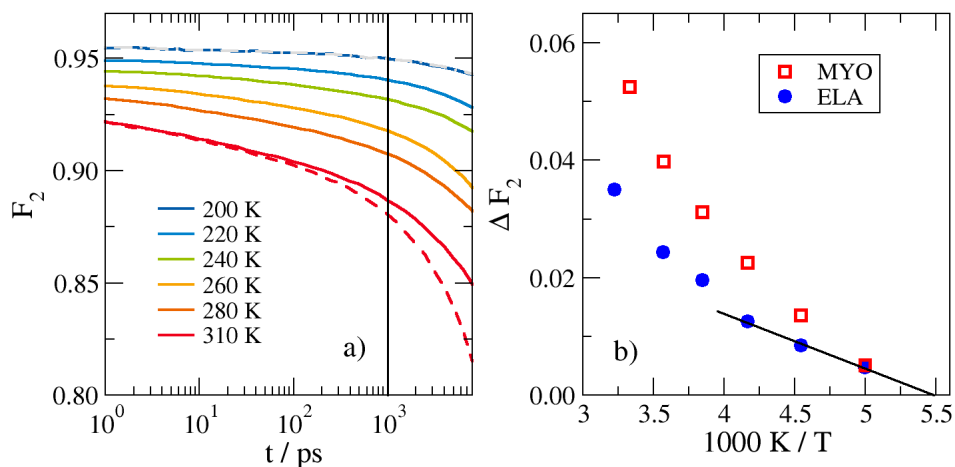


Abb. 8.2: Ergebnisse der MD-Simulationen von Elastin und Myoglobin bei $h = 0.3$ g/g. a) Rotationskorrelationsfunktion F_2 der C=O-Bindung, bei den verschiedenen Temperaturen. Die Korrelationsfunktion nach Korrektur um Rotation und Translation des Gesamtmoleküls sind als durchgezogene Linien dargestellt, die gestrichelte Linie zeigt die unkorrigierten Daten. b) Temperaturabhängigkeit des Korrelationsverlustes im Zeitfenster 1 ps-1 ns für Elastin und Myoglobin. Die durchgezogene Linie dient als Orientierung.

mit einem Zeitinkrement von 1 ps ausgelesen werden, während für Random-Walk-Simulationen zur Berechnung von NMR-Deuteronen-Spektren üblicherweise ein Zeitinkrement von $1 \mu\text{s}$ verwendet wird. Wenn nun ein zeitskalenunabhängiges Potenzgesetz vorliegt, sollten die Trajektorien aus den MD-Simulationen zu einer vergleichbaren Spektrenverschmälerung führen, wie experimentell gefunden. Um die NMR-Zeitskala auf die Zeitskala der Simulationen abzubilden, wird daher eine Quadrupolwechselwirkung von $\delta = 125$ GHz statt der tatsächlichen $\delta = 125$ kHz angenommen.

Die aus den MD-Orientierungstrajektorien bei verschiedenen Temperaturen simulierten NMR-Spektren sind in Abbildung 8.3(a) abgebildet¹. Die simulierten Spektren weisen, wie die experimentellen Spektren in Abbildung 6.1 keine mit bloßem Auge sichtbare Verschmälerung auf. Die Auswertung der relativen spektralen Breite ist in Abbildung 8.3(b) dargestellt. Die Übereinstimmung mit den experimentellen Daten ist fast quantitativ. Dies stützt die Hypothese, dass es sich bei der in der NMR-Spektroskopie beobachteten Bewegung und dem Potenzgesetzabfall um denselben Bewegungsprozess handelt.

¹ In den Simulationen stellte sich heraus, dass die 2000 betrachteten N-H Orientierungen in den 8 Proteinmolekülen das Pulvermittel nicht richtig abbilden. Diese wurde behoben, indem jeder Bindung eine zufällige Startorientierung zugewiesen wurden und die Orientierungstrajektorie relativ dazu in die Random-Walk-Simulationen einfluss.

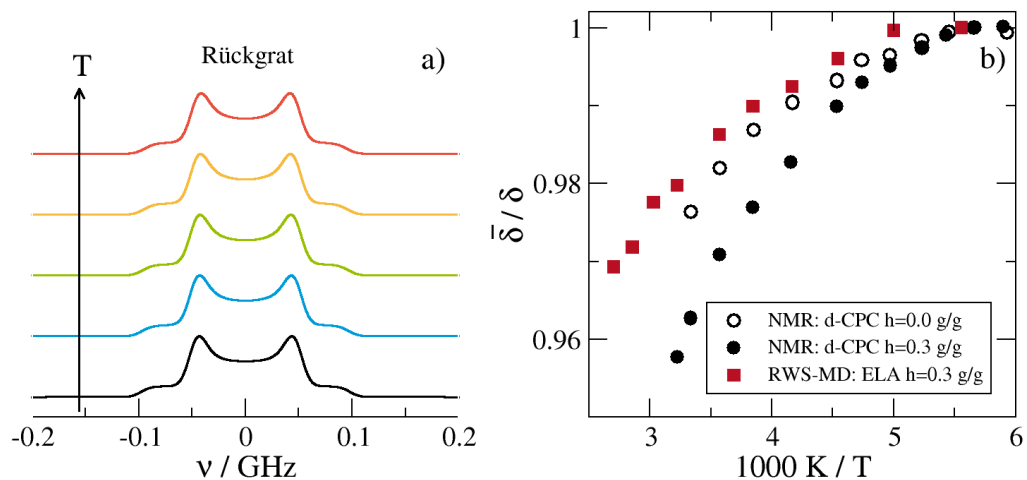


Abb. 8.3: a) Pake-Spektren aus Random-Walk-Simulationen. Sprungzeit und Winkel wurden den Orientierungstrajektorien der N-H-Bindungen aus MD-Simulationen bei verschiedenen Temperaturen entnommen. b) Relative spektrale Breite $\bar{\delta}/\delta$ der nebenstehenden Spektren von Elastin im Vergleich zu experimentellen Ergebnissen an CPC.

8.2 Vergleich der Ergebnisse zur Dynamik des Hydrationswassers

Mit Neutronenstreuexperimenten konnte unter Ausnutzung von Kontrastvariation der Streubeitrag des Hydrationswassers an Elastin extrahiert und dessen Temperaturabhängigkeit charakterisiert werden. Zur Auswertung wurde eine Gaußverteilung von Energiebarrieren und eine Arrhenius-Temperaturabhängigkeit angenommen, wie sie in Messungen mit NMR-Spektroskopie und dielektrischer Spektroskopie für Hydrationswasser gefunden wurde.

Die so gewonnene Temperaturabhängigkeit der Korrelationszeiten ist in Abbildung 8.4 gemeinsam mit den aus NMR-Untersuchungen des Hydrationswassers aus [89, 175] aufgetragen. Zusätzlich sind die Korrelationszeiten $\tau_{0.01}$ aus den MD-Simulationen der Systeme 1ELA und 8ELA aus Abbildung 5.20 als offene Symbole eingezeichnet.

In Übereinstimmung mit den experimentellen Methoden zeigt auch das Hydrationswasser aus den MD-Simulationen in der Nähe des Proteins eine Arrhenius-Temperaturabhängigkeit (vgl. Kap. 5.2). Die Korrelationszeiten aller Methoden weisen eine ähnliche Aktivierungsenergie von ca. $E_a \approx 0.55$ eV auf, jedoch unterscheiden sich die Versuchsfrequenzen um ca. zwei Größenordnungen. Da in den Experimenten Proteine mit unterschiedlichen Hydrationsgraden (QENS: Elastin mit $h = 0.2$ g/g vs. MD-Simulationen und ^2H -NMR-Spektroskopie mit $h = 0.46$ g/g) ist eine quantitative Übereinstimmung zwischen den Methoden nicht zu erwarten. Der qualitative Verlauf und insbesondere die Aktivierungsenergie ist für die Wasserdynamik an der Oberfläche des Proteins mit den drei Methoden jedoch in guter Übereinstimmung.

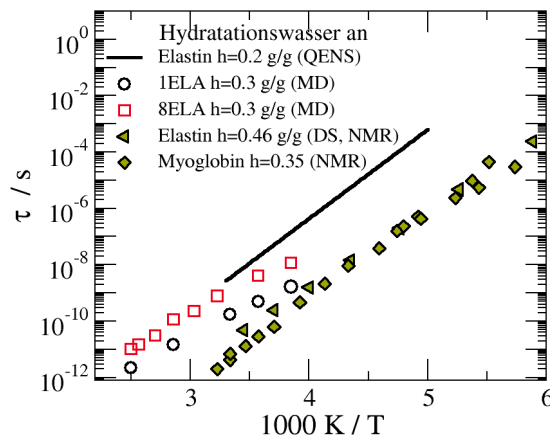


Abb. 8.4: Auftragung der mittels der drei verschiedenen Methoden gewonnenen Korrelationszeiten des Hydratationswassers. Die NMR-Daten stammen aus [89, 175].

Der in allen drei Methoden gefundene Arrheniusverlauf der Korrelationszeiten stimmt gut mit der Charakterisierung des Hydratationswassers an anderen Proteinen überein [89, 175]. Diese Daten stehen jedoch im Widerspruch zu verschiedenen Literaturquellen. Einerseits widerspricht diese Temperaturabhängigkeit dem vorgeschlagenen Fragil-Stark-Übergang (vgl. Kap. 6.3), für den die Gruppe um Chen experimentelle Belege veröffentlicht hat [40]. Darüber hinaus spricht sie gegen die von Doster gefundene fragile Temperaturabhängigkeit der Dynamik des Hydratationswassers [65].

Diese Widersprüche haben Konsequenzen für das Bild, das vom dynamischen Übergang gezeichnet werden kann. Mit diesem Bild beschäftigt sich der folgende Abschnitt.

8.3 Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Kapitel wurden die in dieser Arbeit mit den drei verschiedenen Methoden quasielastischer Neutronenstreuung, NMR-Spektroskopie und MD-Simulationen erhaltenen Ergebnisse zur Dynamik von Proteinen und dem Hydratationswasser vergleichend gegenüber gestellt. Hier soll nun das sich daraus ergebende Gesamtbild für die Protein- und Wasserdynamik vorgestellt werden und in Bezug auf die am Ende von Kapitel 2.3 aufgeworfenen Fragen diskutiert werden.

Zusammenfassung der Ergebnisse

In Proteinen gibt es verschiedene Arten von Bewegungen. Am leichtesten zu separieren und zu identifizieren ist die Methylgruppendynamik. Für die Methylgruppendynamik finden die drei verwendeten Methoden eine Bestätigung des etablierten Dreisplatzsprung-Modells [44]. Die Methylgruppendynamik ist unabhängig vom Hydratationsgrad. In Elastin, das unterhalb seiner Glasübergangstemperatur [229] (vgl. Kap. 4) mit Neutronenstreuung untersucht wurde, ist sie die einzige beobachtete Pro-

teinbewegung. Die Methylgruppenbewegung ist bereits bei tieferen Temperaturen zu beobachten, als die Proteinrückgratbewegung.

Für das Proteinrückgrat wird in der ^2H -NMR-Spektroskopie ein kleinamplitudiger Bewegungsprozess gefunden, dessen Amplitude mit der Temperatur und in Anwesenheit von Wasser zunimmt. Der Prozess setzt mit Erwärmen bei etwa $T \approx 180\text{ K}$ ein. Diese Eigenschaften eines Bewegungsprozesses sind kompatibel mit dem in den MD-Simulationen gefundenen anomalen Abfall der Orientierungs- und Translationskorrelationsfunktionen, dessen Amplitude ebenfalls mit dem Hydratationsgrad und der Temperatur zunimmt (vgl. Abb. 5.18). Die anomale Dynamik lässt sich weitgehend im Rahmen eines fraktionalen Ornstein-Uhlenbeck-Prozesses verstehen.

Beim Vergleich der Temperaturabhängigkeit der Bewegungsamplitude aus dem Fraktionalen Ornstein-Uhlenbeck-Prozess mit jener des Konusmodell, das zur Auswertung der NMR-Daten herangezogen wurde, ergibt sich eine Abweichung: Während das Konusmodell einen exponentielle Anstieg des Öffnungswinkels mit der Temperatur liefert, ist die Amplitude der Bewegung in einem harmonischen Potential linear von der Temperatur abhängig. Dieser Widerspruch und kleinere Abweichungen der Krümmung der Streufunktion von der Vorhersage geben der Interpretation Raum, dass es sich bei dem Proteinrückgratprozess, um eine β -Relaxation mit einer breiten Verteilung von Korrelationszeiten handeln könnte.

Über den kleinwinkligen Rückgratprozess hinaus wird in der NMR-Spektroskopie noch ein isotroper, von der Anwesenheit des Wassers abhängiger Prozess beobachtet, dessen Ursprung nicht eindeutig zugeordnet werden kann (vgl. Kap. 6.1.4). Auch in MD-Simulationen ist bei langen Zeiten ein zweiter Prozess identifizierbar. Dieser kann einer subdiffusiven Schwerpunktsbewegung (vgl. Kap. 5.1.2) der Rückgratatome zugeordnet werden. Ob diese beiden Prozesse einen gemeinsamen Ursprung haben, kann an Hand der vorliegenden Daten nicht entschieden werden. Der Proteinprozess in den MD-Simulationen ist mit einer Zeitabhängigkeit von $t^{0.5}$ verbunden. Dieser Prozess schneidet den anomalen Korrelationsabfall ab und ist an Wasser gekoppelt (vgl. Abb. 5.20). Er kann nicht als α -Prozess interpretiert werden, da der zugehörige gestreckt-exponentielle Abfall in der Streufunktion fehlt. Weiteren Aufschluss über den hinteren Abfall könnte eine Verbesserung der Datenqualität durch längere Simulationen bringen.

Die Ergebnisse der untersuchten Proteine Elastin, Myoglobin und CPC wurden einerseits untereinander verglichen und andererseits mit Proteindaten aus der Literatur, wie Lysozym und Apoferritin. Im untersuchten Temperatur- und Zeitbereich, sowie bei den verwendeten niedrigen Hydratationsgraden treten keine qualitativen Unterschiede in der Dynamik der verschiedenen Proteine auf. Die hier beschriebenen schnellen Rückgrat- und Methylgruppenbewegungen scheinen universell für die meisten Proteine zu sein.

Für das Hydrationswasser an den untersuchten Proteinen wurden mit Neutronenstreuung, MD-Simulationen, ^2H -NMR-Spektroskopie [175] und dielektrischer Spektroskopie [89] Aktivierungsenergien und Temperaturabhängigkeiten bestimmt, die miteinander in qualitativer Übereinstimmung stehen (vgl. Abb. 8.4). Eine genauere Analyse der Wasserdynamik mit MD-Simulationen zeigt, dass die Fragilität der Temperaturabhängigkeit des Hydrationswassers vom Abstand zum Protein abhängt. Nur für das proteinnahe Wasser wird eine Arrhenius-Temperaturabhängigkeit gefunden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Simulationen von Wasser in der Nähe von anderen Grenzflächen überein [140, 155].

Diskussion des dynamischen Übergangs

In Kapitel 2.3 wurden vier Ansichten zum dynamischen Übergang vorgestellt, die nun diskutiert werden sollen.

Das Versklavungsmodell von Frauenfelder erweist sich im Lauf der Arbeit als zu einseitig. Zwar wird ein paralleler Verlauf der Korrelationszeiten von Oberflächenwasser und Proteindynamik gemäß einem Arrheniusgesetz gefunden (vgl. Abb. 5.18), wie im Modell vorhergesagt, jedoch zeigen die Simulationen von Protein-Wasser-Mischungen mit verschiedenen Wassertemperaturen, sowie die Auswertung der Wasserdynamik in Abhängigkeit vom Proteinabstand, dass die Wasserdynamik nicht einseitig die Proteindynamik beeinflusst, sondern selbst auch von der Proteindynamik abhängt. Das Versklavungskonzept von Frauenfelder nutzt aus, dass sich die Fragilität des Hydrationswassers als Funktion des Abstands vom Protein ändert. So können prinzipiell alle Arten von Proteindynamik, ungeachtet ihrer Temperaturabhängigkeit als „was-sergekoppelt“ im Sinne von paralleler Temperaturabhängigkeit der Korrelationszeiten dargestellt werden. Zur Überprüfbarkeit fehlt dem Modell eine quantitative Beziehung zwischen den Korrelationszeiten von Wasser und Protein, bzw. den Korrelationszeiten des Wassers und des mittleren Verschiebungsquadrats des Proteins². Der zweite im Modell von Frauenfelder nur bei höheren Hydrationsgraden auftretende Proteinprozess, die Protein- α -Relaxation, konnte in den Simulationen mit höheren Hydrationsgraden nicht identifiziert werden. Damit unterstützen die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse die Kritik von Doster et al. [64], Capaccioli et al. [34] und Khodadadi et al. [137] am Bild der Versklavung.

Das von Chen vorgelegte Modell zum dynamischen Übergang geht von einem Fragil-Stark-Übergang des Hydrationswassers aus. Anzeichen für einen solchen konnten weder in den MD-Simulationen noch mittels der Neutronenstreuung gefunden werden. Dies steht in guter Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen [225, 270]. Die hier vorgelegte Analyse bleibt jedoch, wie in Kapitel 7.3 ausführlicher diskutiert, vorläufig und die Aussagekraft muss mit Vorsicht beurteilt werden.

² Das Fehlen dieser quantitativen Aussage ermöglicht, dass die mit den beiden Methoden Neutronenstreuung [79] und Mößbauerspektroskopie [39] gewonnenen MSD's von Myoglobin durch unterschiedliche Skalierungsfaktoren auf dieselbe Verteilung der Korrelationszeiten skaliert werden, obwohl die Zeitskala beider Experimente sich um den Faktor 100 unterscheidet.

Die vorgestellten Daten lassen sich am ehesten vor dem Hintergrund der beiden zweistufigen Modelle des dynamischen Übergangs von Doster und Ngai [34, 60] einordnen. Oberhalb von ca. $T = 180$ K, also oberhalb des von Ngai und Doster vorgeschlagenen Glasübergangs des Hydratationswassers wurde eine Amplitudenerhöhung der Rückgratbewegung mit NMR-Spektroskopie und MD-Simulationen gefunden. Wenn NMR-Spektroskopie und MD-Simulationen denselben Prozess sehen, so ist dieser von der Zeitskala des Experiments unabhängig, weil die Korrelationsfunktionen in diesem Bereich den anomalen Abfall zeigen. Dieser Prozess ist deshalb nur mit dem Tieftemperaturanstieg des MSD in Verbindung zu bringen, da dieser nach Doster und Ngai unabhängig von der Zeitskala des Experiments ist. In der Neutronenstreuuntersuchung könnte dieser Prozess durch die Methylgruppendynamik überlagert und folglich nicht zu sehen sein.

Wie in Abschnitt 8.1.2 dieses Kapitels gezeigt, ist der Prozess, der zu einem Einsetzen der Proteindynamik bei tieferen Temperaturen führt, in Übereinstimmung mit dem Einsetzen des Potenzgesetzprozesses. Ein solcher, in der Frequenzdomäne mit einem nearly constant loss verbundener Prozess wird von Ngai et al. [34] für die erste Stufe des dynamischen Übergangs vorgeschlagen und lässt sich mit den hier vorgelegten Ergebnissen vereinbaren.

Diese Interpretation ist jedoch nicht vollständig konsistent mit den experimentellen Ergebnissen. Es bleibt offen, weshalb in CPC sowohl in der trockenen als auch in der hydratisierten Probe ein Einsetzen von Proteindynamik beobachtet wird, während in anderen experimentellen Studien [175, 221] für trockenes Protein kein Einsetzen von Rückgratdynamik gemessen wird. Möglicherweise spielt die Sensitivität der verwendeten Methoden eine Rolle. So beobachten Hayward et. al. [106] in MD-Simulationen auch an trockenen Proteinen das Einsetzen von anharmonischer Dynamik. Diese könnte durch Wasser vereinfacht werden und ist mit der auf kleinwinklige Prozesse weniger sensitiven Methode Neutronenstreuung für trockenes Protein evtl. nicht sichtbar.

Die zweite Stufe des dynamischen Übergangs konnte in den hier vorgestellten Studien nicht eindeutig identifiziert werden. Zwei Prozesse kommen in Frage: Zum einen der in der NMR-Spektroskopie bei ca. 240 K einsetzende isotrope Prozess. Dieser wird nur von einem Teil der Deuteronen (vgl. Kap. 6.1.4) ausgeführt und der Anteil des Proteins, der an diesem Prozess teilnimmt, steigt mit steigendem Hydratationsgrad. Zum anderen der in MD-Simulationen beobachtete hintere Abfall.

In diesem Zusammenhang bleibt jedoch die Frage offen, warum in MD-Simulationen dieser hintere Prozess für Elastin und Myoglobin in qualitativer Übereinstimmung beobachtet wird, obwohl die DSC-Experimente für beide Proteine ein unterschiedliches Verhalten erwarten lassen, da der Protein-Glasübergang in Myoglobin bei $T \approx 210$ K [123] bei Elastin hingegen erst bei $T > 300$ K [229] beobachtet wird. Eine mögliche Ursache könnte in einer unzureichenden Repräsentation des Elastins in den MD-Simulationen durch die Sequenz (VPGVG)₅₀ liegen. Andererseits deuten auch ¹³C-Experimente an Elastin an ein Vorliegen von Proteinrückgratdynamik bei Temperatu-

ren $T < 300\text{ K}$ hin, die nicht mit den der Interpretation der Stufe in den DSC-Daten als Glasübergang des Elastins in Einklang steht. Um dies zu klären, könnten Neutronenstreuexperimente bei höherer Temperatur durchgeführt werden. Setzt bei $T = 325\text{ K}$ ein zusätzlicher dynamischer Prozess des Elastins (mit $h = 0.2\text{ g/g}$) ein, so spricht das für die Interpretation von Samouillan et al. [229], andernfalls wird die Hypothese gestützt, dass die Art des Proteins keinen starken Einfluss auf die hier untersuchte Dynamik hat.

Im Bild von Doster wird für den Wasserprozess, der an die Proteindynamik koppelt ein Vogel-Fulcher-Verhalten vorausgesagt. In dieser Arbeit wird jedoch ein Arrhenius-Verhalten gefunden. Doster schließt eine Arrhenius-Temperaturabhängigkeit für den Prozess, der den dynamische Übergang verursacht jedoch aus [58]. Damit ist sein Ansatz prinzipiell im Widerspruch zur Temperaturabhängigkeit der Hydratationswasserdynamik, wie sie mit NMR- und dielektrischer Spektroskopie gefunden wurde [89, 175] (vgl. Kap. 6.3).

Die Annahme eines proteinunabhängigen, dynamischen Prozesses des Hydratationswassers widerspricht ebenfalls den Interpretationen der DSC-Messungen, dass es unterschiedliche Glasübergangstemperaturen für Elastin [229] und Myoglobin [123] gibt. Wenn die Dynamik des Wassers unabhängig vom Protein ist, wie die Untersuchungen von Gainaru und Lusceac [89, 175] vermuten lassen und wenn weiterhin eine enge Kopplung von Protein und Hydratationswasser besteht, wie die MD-Simulationen nahelegen, dann sollte auch die Glasübergangstemperatur bei einer ähnlichen Temperatur zu finden sein. Auch um diese Frage zu klären, wären die oben vorgeschlagenen Messungen von Elastin bei höheren Temperaturen hilfreich.

Prinzipielle Erwägungen zum dynamischen Übergang

Bei der Diskussion des dynamischen Übergangs ergeben sich mehrere prinzipielle Schwierigkeiten.

(1) Zur Analyse der Übergangstemperatur wird üblicherweise eine lineare Auftragung des mittleren Verschiebungsquadrats verwendet. Die Übergangstemperatur wird folglich bei der Temperatur gefunden, bei der das MSD die gewählte Skalierung erreicht. Nun wurde im Verlauf der Arbeit gezeigt, dass verschiedene Methoden (experimentelle aber auch Auswertungsansätze) große Unterschiede im MSD ergeben (vgl. Kap. 2.3 und Kap. 5.1.2). Eine einheitliche lineare Skalierung kann daher nicht gewählt werden und die Temperatur des dynamischen Übergangs wird dadurch möglicherweise willkürlich gewählt.

Doster [59] legte fest, dass eine Vogel-Fulcher-Tammann-Abhängigkeit der Zeitskala oder exponentielle Amplitudenänderung vorhanden sein muss, um einen dynamischen Übergang zu sehen. Um jedoch ein Einsetzen eines dynamischen Prozesses auf der linearen Skala zu sehen, ist das jedoch nicht notwendig. [79]. Diese Frage ist eine prinzipielle, keine reine Definitionsfrage: Es geht darum, ob das beobachtete Einsetzen

der Proteindynamik ein physikalisch relevanter Prozess, gleich dem Glasübergang ist, oder ob es sich um einen trivialen Effekt handelt.

(3) Hilfreich für die weitere Diskussion wäre daher eine einheitliche Definition der dynamischen Übergangstemperatur, die nicht von der Skalierung der Achsen abhängt. Problematisch ist hierbei, dass der dynamische Übergang in einer logarithmischen Auftragung nicht sichtbar ist (vgl. Abb. 2.8 und 8.1). Möglicherweise könnte ein standardisiertes Auswertungsverfahren, wie z.B. das kürzlich von Doster vorgestellte [64], gefunden werden und dann eine definierte Amplitude von z.B. 1 \AA als fester Grenzwert für die Temperatur des dynamischen Übergangs eingeführt werden. Erst dann kann es gelingen Experimente mit verschiedenen Zeit- und Längenskalen quantitativ miteinander zu vergleichen und das Potential der verschiedenen Ansätze voll auszunutzen.

Ungeachtet der hier diskutierten Schwierigkeiten zeigt die Arbeit jedoch auf, dass sich mit Hilfe der drei Methoden quasi-elastische Neutronenstreuung, MD-Simulationen und NMR-Spektroskopie konsistente Ergebnisse zur Charakterisierung der Proteindynamik gewinnen lassen.

Die Untersuchung des Proteins Elastin mit der ungewöhnlich hohen Glasübergangstemperatur erscheint geeignet, um die Fragestellungen zum dynamischen Übergang weiter zu untersuchen. Einerseits ergaben die Untersuchungen des Hydratationswassers keine Abweichung von der Untersuchung des Hydratationswassers anderer Systeme. Andererseits wird in der Neutronenstreuung kein Hinweis auf einen dynamischen Übergang gefunden. Dies spricht erneut gegen eine Versklavung des Proteins durch das Wasser und dafür, dass auch proteinspezifische Eigenschaften einen Beitrag zum Einsetzen der Dynamik leisten.

In zukünftigen Arbeiten wäre es interessant Elastin bei höheren Temperaturen zu untersuchen, um zu überprüfen, ob oberhalb der von Samouillan [229] gefundenen Glasübergangstemperatur des hydratisierten Elastins ein dynamischer Übergang gefunden werden kann. Ergänzend dazu wäre es hilfreich, eine ^2H -NMR-Charakterisierung von zumindest teilweise deuteriertem Elastin mit den drei hier verwendeten NMR-Methoden zu wiederholen, um zu prüfen, ob das Einsetzen der kleinamplitudigen Rückgratbewegung mit dem dynamischen Übergang in Zusammenhang steht, oder ob sie, wie von den MD-Simulationen nahegelegt von der Art des Proteins unabhängig ist.

9 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Dynamik von Proteinen und des umgebenden Hydratationswasser mit einer Kombination aus drei Methoden untersucht. Zum Einsatz kamen MD-Simulationen, ^2H -NMR-Spektroskopie und quasielastische Neutronenstreuung. Mittels dieser Methoden kann ein breiter Bereich an Längen- und Zeitskalen der Proteindynamik abgedeckt werden. Die Untersuchungen wurden an den Proteinen Elastin, Myoglobin und Cyano-Phycocyanin mit niedrigen Hydratationsgraden durchgeführt.

Die untersuchten Fragestellungen lauteten:

1. Welche dynamischen Prozesse lassen sich mit den verwendeten Methoden identifizieren?
2. Inwieweit lässt sich die Proteindynamik in Analogie zur Glasdynamik beschreiben?
3. Wie lässt sich der anomale Abfall des Proteins beschreiben?
4. Welche Kopplung besteht zwischen Wasser- und Proteindynamik?
5. Welche Informationen zur Wasserdynamik liefert die Neutronenstreuung an Elastin?
6. Wie lässt sich der dynamische Übergang erklären?

(1) und (2): Mit den drei verwendeten Methoden können verschiedene dynamische Prozesse des Proteins identifiziert werden. Die beiden wichtigsten sind die Methylgruppenrotation und eine kleinwinklige Rückgratbewegung.

Methylgruppen führen bei Raumtemperatur eine schnelle Dreiplatzsprungbewegung aus. Diese Bewegung konnte mit quasi-elastischer Neutronenstreuung an einer mit deuteriertem Wasser hydratisierten Elastinprobe identifiziert und charakterisiert werden (s. Kap. 7). Methylgruppen liegen im Protein in lokal unterschiedlichen Umgebungen vor und lassen sich folglich mit einer Verteilung von Rotationskorrelationszeiten, im Rahmen des Rotationsraten-Verteilungsmodells [44] beschreiben. Der Fit ist nicht eindeutig möglich, da die drei Fitparameter des Modells nicht unabhängig voneinander sind. Unter Festlegung der Versuchsfrequenz ergibt sich bei einer Aktivierungsenergie von $E_a = 0.17 \text{ eV}$ und bei einer Verteilungsbreite von $\sigma_E = 0.04 \text{ eV}$ eine exzellente Übereinstimmung mit den Literaturwerten [221, 256]. Zur Auswertung wurde die inelastische Fenstermessung herangezogen. Dies ist eine Methode, bei der analog zur T_1 -Bestimmung in der NMR, der dynamische Strukturfaktor bei einer festen

Frequenz abgetastet wird. Zwischen den Ergebnissen der ^2H -NMR-Spektroskopie und der Neutronenstreuung sowie den MD-Simulationen der Methylgruppen konnte eine gute Übereinstimmung gefunden werden.

Mittels ^2H -NMR-Spektroskopie wurde eine kleinwinklige Proteinrückgratbewegung identifiziert, die bei ca. $T = 180\text{ K}$ einsetzt und deren Amplitude mit der Temperatur und in Anwesenheit von Wasser zunimmt (s. Kap. 6). Um diese Bewegung zu charakterisieren, wurden drei Experimente der ^2H -NMR-Spektroskopie eingesetzt: Messung der Spin-Gitter-Relaxationszeit, Messung von Spektren und Stimulierte-Echo-Experimente. Damit wurde der volle zugängliche Zeitbereich der Methode ausgenutzt. In Ergänzung zu den durchgeführten Messungen wurden Random-Walk-Simulationen von Spektren durchgeführt und verschiedene Bewegungsmodelle systematisch auf ihren Einfluss auf die Spektrenform untersucht (s. Kap. 6.2.1). Als Ergebnis wurde erhalten, dass die experimentell gefundenen Spektren sich nicht durch einfache Bewegungsmodelle mit nur einer Korrelationszeit oder einer definierten Geometrie nachbilden lassen. Einen vielversprechenden Ansatz liefert dagegen die Annahme einer Winkelverteilung, wie sie auch in MD-Simulationen beobachtet wurde. In MD-Simulationen wurde der anomale Abfall im Zeitbereich von ps-ns untersucht (vgl. Kap. 5). Der anomale Abfall zeigt ein qualitativ ähnliches Verhalten wie der in der ^2H -NMR-Spektroskopie identifizierte Rückgratprozess.

Über den kleinwinkligen Rückgratprozess hinaus wird in der NMR-Spektroskopie bei hohen Temperaturen und in Anwesenheit von Wasser ein isotroper Prozess beobachtet. An diesem nimmt jedoch nur ein kleiner Teil der Moleküle teil und er kann folglich nicht mit der Strukturrelaxation identifiziert werden. Auch in MD-Simulationen wird im Anschluss an den Zeitbereich des anomalen Abfalls ein weiterer Proteinprozess gefunden. Dieser weist ein Rouse-ähnliches Verhalten auf. Ob und inwieweit Proteindynamik im Rahmen des Rousemodells oder verwandter Modelle zur Beschreibung von Polymerdynamik verstanden werden kann, könnte eine weiterführende Analyse klären.

(3) Der anomale Abfall in den Rotations- und Translationskorrelationsfunktionen wurde in dieser Arbeit in Kapitel 5.1.1 näher untersucht. Zur Beschreibung wurden drei verschiedene Ansätze herangezogen: Der Energielandschaftsansatz, die Modenkopplungstheorie höherer Ordnung und der fraktionale Fokker-Planck-Ansatz. Alle drei Ansätze stellen Fitfunktionen bereit, mit denen sich der anomale Abfall gut anpassen lässt. Unterschiede ergeben sich in den Vorhersagen zur Temperaturabhängigkeit. Die in den Simulationen erhaltene Temperaturabhängigkeit wird am besten mittels des fraktionalen Ornstein-Uhlenbeck-Prozesses beschrieben. Dieses Modell geht von der Bewegung eines Teilchens in einem rauen harmonischen Potential aus. Bei der mikroskopischen Analyse konnte die harmonische Form des lokalen Potentials bestätigt werden.

(4) Mit Hilfe der MD-Simulationen konnte die Kopplung zwischen Protein und Wasser genauer charakterisiert werden. Dabei wird in Simulationen mit separaten Wärmebädern für Protein und Wasser, sowohl ein Einfluss des Wassers auf die Proteindynamik als auch ein umgekehrter Einfluss des Proteins auf die Wasserdynamik gefunden. Somit unterstützen die vorgelegten Ergebnisse die Kritik [34, 64, 137] am sogenannten

Verklavungsmodell [39, 74], bei dem von einer einseitigen Abhängigkeit des Proteins vom Wasser ausgegangen wird. Mittels MD-Simulationen wird für die Wasserdynamik darüber hinaus eine starke Abstandsabhängigkeit vom Protein gefunden. Je weiter ein Wassermolekül von der Proteinoberfläche entfernt ist, desto fragiler wird seine Temperaturabhängigkeit. An der Oberfläche des Proteins folgt die Temperaturabhängigkeit des Wassers nahezu einem Arrhenius-Verlauf.

(5) Mit quasielastischer Neutronenstreuung konnten unter Ausnutzung des Prinzips der Kontrastvariation der Streubeitrag des Wassers gewonnen werden. Die Dynamik des Hydrationswassers wurde unter Verwendung von inelastischen Fenstermessungen charakterisiert. Die Analyse ergibt keinen Hinweis auf einen Fragil-Stark-Übergang, sondern findet sich in guter Übereinstimmung mit Messungen der NMR-Spektroskopie und der dielektrischen Spektroskopie [89, 173]. Die Analyse bleibt vorläufig, da die qualitative Übereinstimmung der Fitparameter mit den Literaturdaten nicht unabhängig aus der Auswertung erhalten wurde, sondern als Randbedingung festgesetzt wurde. Zur unabhängigen Analyse sind Daten besserer Qualität oder bei höheren Temperaturen notwendig.

(6) Die vorgestellten Ergebnissen wurden in Kapitel 8 mit vier Modellen zum dynamischen Übergang verglichen. Dabei kann keine klare Unterstützung eines Modells zum dynamischen Übergang erhalten werden. Einerseits wird zwar der Rückgratprozess gefunden, der bei der vorgeschlagenen tieferen Temperatur im Modell eines zweistufigen Übergangs einsetzt, andererseits kann die Signatur der Stufe bei höherer Temperatur nicht eindeutig zugewiesen werden. In Kapitel 8 wird zudem auf prinzipielle Schwächen der Begriffsdefinition des dynamischen Übergangs und der Auswertung eingegangen. Bevor die Kontroverse um den dynamischen Übergang beigelegt werden kann, müssen diese prinzipiellen Fragen geklärt werden.

Die Verwendung der drei Methoden ermöglicht es einen umfassenden Blick auf die Proteindynamik zu werfen. Der Vergleich aller drei Methoden ist für die Methylgruppendynamik möglich, da diese in allen drei Methoden zu sehen ist. Zwischen den Ergebnissen verschiedener Methoden zeigen sich quantitative Unterschiede. Qualitativ ist die Übereinstimmung für die Methylgruppen gut. Eine qualitative Übereinstimmung ergibt auch der Vergleich der mit ^2H -NMR-Spektroskopie und MD-Simulationen untersuchten Rückgratdynamik. Diese qualitative Übereinstimmung konnte durch eine Kombination von MD-Trajektorien mit Random-Walk-Simulationen bei der Simulation von Spektren untermauert werden. Der Ansatz, die drei Methoden zu kombinieren, erweist sich folglich auch für einen zukünftigen Einsatz zur weiteren Charakterisierung der Dynamik in hydratisierten Proteinen als vielversprechend.

Abkürzungsverzeichnis

1ELA Simulation mit einem Elastinmolekül

8ELA Simulation mit 8 Elastinmolekülen

8ELA-AA Simulation mit 8 Elastinmolekülen und einem all-atoms Kraftfeld (OPLS-AA)

CPC Cyano-Phycocyanin

DS Dielektrische Spektroskopie

DSC differential scanning calorimetry - Dynamische Differenzkalorimetrie

EISF Elastischer inkohärenter Strukturfaktor

ELA Elastin

FST Fragil-Stark-Übergang

FRMII Forschungsreaktor München II

ISF Intermediäre inkohärente Streufunktion

ILL Institut-Laue-Langevin

JG Johari-Goldstein

KWW Kohlrausch-William-Watts

LLCP liquid liquid critical point - Flüssig-Flüssig-Kritischer-Punkt

MCM mobile composition of matter - poröses Silikatmaterial mit geordneten Poren

MCT Modenkopplungstheorie

MD Molekulardynamik

MSD mean square displacement - mittleres Verschiebungsquadrat

MYO Myoglobin

NMR nuclear magnetic resonance - Kernspinresonanz

NS Neutronenstreuung

NCL nearly constant loss

OCF Orientierungsautokorrelationsfunktion

PDB protein data bank - Proteindatenbank

PFG pulsed field gradient - gepulster Feldgradient

QENS Quasielastische Neutronenstreuung

RJoaC random jump on a cone - Zufallssprung auf einem Konusrand

RRDM rotation rate distribution model - Rotationsraten-Verteilungsmodell

SFG static field gradient - statischer Feldgradient

SPHERES spectrometer for high energy resolution- Spektrometer für hohe Energieauf-
lösung

STE Stimuliertes Echo

Abbildungsverzeichnis

2.1. Relaxationsprozesse in unterkühlten Flüssigkeiten - Korrelationszeiten und Korrelationsabfall.	8
2.2. Relaxationsprozesse in unterkühlten Flüssigkeiten - Mikroskopisches Bild.	9
2.3. Das Doi-Edwards-Modell.	11
2.4. Darstellung einer Peptidbindung.	12
2.5. Radiale Paarverteilungsfunktion von Wasser.	13
2.6. Energielandschaft nach Frauenfelder [79,81].	17
2.7. Veranschaulichungen des Potentials und des Phasendiagramms zur Modenkopplungstheorie höherer Ordnung	21
2.8. MSD von Lysozym a) trocken und hydratisiert b) in verschiedenen Lösemitteln	25
3.1. Auftragung des Imaginärteils verschiedener Suszeptibilitäten: Cole-Cole, Cole-Davidson, Log-Gauß.	38
3.2. Pulssequenz des Festkörperechos aus [147].	45
3.3. Spektrale Dichte für verschiedene Temperaturen und T_1 -Minimum	45
3.4. Linienformentwicklung des Deuteronenpulverspektrums	47
3.5. Definition der spektralen Breite $\bar{\delta}$ und der relativen zentralen Intensität R/H	48
3.6. Pulssequenz des Stimulierten-Echo-Experiments nach [239].	48
3.7. Stimuliertes-Echo-Signal aus Random-Walk-Simulationen unter Variation der Evolutionszeit und des Winkels.	49
3.8. Das Konusmodell in den Random-Walk-Simulationen.	51
3.9. Streuvektorabhängige Streuintensität des Elastin mit Strukturpeak. . . .	54
3.10. Schematischer Strahlengang am Rückstreuспекrometer SPHERES am FRM II in München.	56
3.11. a) Spektrum bei $q = 0.96 \text{ \AA}^{-1}$ (Punkte) mit Gaußfit (Linie) b) Breite des Spektrums bei 5 K als Funktion des Streuvektors.	58
3.12. Auswertung des MSD aus Neutronenstreuexperimenten	61
3.13. Veranschaulichung zu Gleichung (3.88)	68
3.14. Vergleich der mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden zugänglichen Zeit- und Längenskalen.	69
3.15. Überblick über die Observablen der verschiedenen Methoden und ihre Relationen zueinander.	70
4.1. Strukturbilder der verwendeten Proteine Elastin, Myoglobin und CPC . .	72
4.2. Glasübergangstemperatur von Elastin-Wasser-Gemischen gemessen mit DSC	72
4.3. DSC-Messungen an Elastin	77

4.4. Messung des Hydratationsverlaufs von Elastin und Lysozym	78
5.1. Orientierungsautokorrelationsfunktion der Carbonylgruppen von Elastin und Myoglobin bei verschiedenen Temperaturen.	83
5.2. Intermediäre Streufunktion der Stickstoffatome für verschiedene Systeme	83
5.3. Temperaturabhängigkeiten der Fitparameters n und k^{Peak} nach dem Energielandschaftsmodell.	85
5.4. Inkohärente intermediäre Streufunktion mit Fit nach der MCT	87
5.5. Fitparameter für a) Elastin und b) Myoglobin als Funktion des Streuvektors q für verschiedene Temperaturen T	88
5.6. Streuvektorabhängigkeit des Fitparameters H_q'' für hydratisiertes Elastin bei 280 K.	89
5.7. Mittleres Verschiebungsquadrat und intermediäre inkohärente Streufunktion mit Fits nach dem FOU-Modell	91
5.8. $S(q, t)$ für Elastin bei $T = 245$ K für verschiedene q und Anpassung nach dem FOU-Modell	92
5.9. a) Mittleres Potential $U(x - \bar{x})$ der Stickstoffatome von Elastin 8ELA als Funktion der Trajektorienlänge für $T = 310$ K.	95
5.10. Überblick über Beispiele von Trajektorien und den zugehörigen Potentialen.	96
5.11. Analyse der Kraftkonstanten.	98
5.12. Bedingte Wahrscheinlichkeitsfunktion und Van-Hove-Translationsfunktion	99
5.13. Winkelverteilungsfunktion bei verschiedenen Temperaturen	101
5.14. MSD und $S(q, t)$ der Stickstoffschwerpunkte des Elastins.	102
5.15. MSD der Stickstoffschwerpunkte des Myoglobins und Vergleich der MSD von Elastin und einem Polymer aus FFC.	103
5.16. Intermediäre Streufunktion für Wasser an 8ELA in a) linearer Darstellung b) logarithmischer Darstellung.	105
5.17. Intermediäre Streufunktion für Systeme mit unterschiedlichem Hydratationsgrad und als Funktion des Abstandes.	106
5.18. Inkohärente intermediäre Streufunktion des Wassers in Abhängigkeit des Hydratationsgrades und Relaxationszeit.	108
5.19. Ergebnisse der Simulationen mit getrennten Wärmebädern für Protein und Wasser	109
5.20. Korrelationszeiten des Wassers und Vergleich mit den Korrelationszeiten der Proteinrückgratdynamik.	110
6.1. ^2H -NMR-Spektren von CPC bei verschiedenen Temperaturen.	115
6.2. Temperaturabhängigkeit der spektralen Breite der Spektren von trockenem und hydratisiertem CPC.	115
6.3. Modelle für die Temperaturabhängigkeit einer kleinwinkligen Bewegung.	116
6.4. Magnetisierungsaufbaukurven der trockenen und der hydratisierten Probe.	119
6.5. Stimulierte-Echo-Signale von CPC.	122
6.6. ^2H -NMR-Spektren bei verschiedenen Hydratationsgraden.	123

6.7. Spin-Gitter-Relaxationszeit bei verschiedenen Hydratationsgraden. . . .	124
6.8. Spektrale Breite und relative zentrale Intensität für verschiedene Bewegungsmodelle	127
6.9. Berechnung des charakteristischen Winkels des Bewegungsmodells mit exponentieller Winkelverteilung in eine Temperaturskala.	129
6.10. Berechnung der Spin-Gitter-Relaxationszeit aus verschiedenen Bewegungsmodellen.	131
6.11. Magnetisierungsaufbaukurven und Streckungsparameter für das Bewegungsmodell mit der exponentiellen Winkelverteilung.	133
6.12. Arrheniusplot der Korrelationszeiten des Proteinhydratationswassers von Elastin, Myoglobin, Lysozym und Collagen [89,174].	135
7.1. Elastische Intensität und MSD für ELA_D ₂ O	141
7.2. Quasielastische Spektren der Probe Elastin mit $h = 0.2 \text{ g/g}$ im Energiebereich $\omega < 3 \mu\text{eV}$ für vier Temperaturen, sowie in Abhängigkeit des Streuvektors.	142
7.3. Logarithmisch skalierte Spektren der Probe Elastin $h = 0.2 \text{ g/g}$	144
7.4. IFWI für große q und Fits mit Gleichung (7.6).	147
7.5. Beispiel eines Fit des Spektrum der Probe ELA_D ₂ O mit Gleichung (7.9).	150
7.6. Arrheniusplot der Korrelationszeiten von Hydratationswasser. Zusätzlich zu den NMR Daten aus [89, 174] sind die Messungen an Lysozym von Chen [40] (blaue Linie) und an CPC von Doster [61] (rote Linie) aufgetragen.	151
7.7. Veranschaulichung des Prinzips Kontrastvariation in der Neutronenstreuung.	152
7.8. Quasielastische Spektren und Inelastische Fensterintensität der beiden Proben	153
7.9. Inelastische Fensterintensität des Wassers.	155
7.10. Korrelationszeiten für Hydratationswasser an Lysozym nach Chen [40] und daraus berechnete inelastische Fensterintensität	158
8.1. a) Mittleres Verschiebungsquadrat für Rückgrat-Protonen und Methylgruppen-Protonen im Zeitintervall von 2 ns. b) T_1 -Daten aus Abb. 6.4 und Fit der Daten mit dem Rotationsraten-Verteilungsmodell.	163
8.2. Rotationskorrelationsabfall als Funktion der Temperatur zum Vergleich von MD-Simulation und NMR-Spektroskopie.	166
8.3. Ergebnisse der Random-Walk-Simulationen von NMR-Spektren ausgehend von MD-Trajektorien	167
8.4. Korrelationszeiten des Hydratationswassers aus allen drei Methoden.	168
A.1. Orientierungs-van-Hove-Funktion für Wasser bei verschiedenen Temperaturen	207
A.2. Relative zentrale Intensität der Modelle „Ratenänderung“ und „Amplitudenänderung“ bei Veränderung der Verteilungsbreite	208

A.3. Spektrale Breite und relative zentrale Intensität von Spektren simuliert mit einer Gaußverteilung von Winkeln.	208
A.4. Spektrale Breite und relative zentrale Intensität von Spektren simuliert mit einer exponentiellen Winkelverteilung ohne Cutoff.	209
A.5. Anteil der durch Wasser verursachte Streuung im inelastischen Fensterscan bei verschiedenen Streuvektoren.	213
A.6. QISF für a) eine Dreiplatzsprungbewegung einer Methylgruppe, b) die verschiedenen Summanden der QISF einer isotropen Rotationsdiffusion.	214

Tabellenverzeichnis

2.1. Vereinfachender Überblick über die vier vorgestellten Modelle zum dynamischen Übergang	32
3.1. Übersicht über den Messprozess ausgehend vom Hamiltonoperator bis zur Messgröße für ^2H -NMR-Spektroskopie (links) und Neutronenstreuung (rechts).	37
3.2. Streuquerschnitte $\sigma = 4\pi b^2$ der für biologische Proben wichtigsten Isotope in 10^{24} cm^2	55
3.3. Vergleichende Zusammenstellung der Eigenschaften der Rückstreuспекrometer SPHERES und IN16	59
3.4. Übersicht über die simulierten Systeme.	65
4.1. Eingesetzte Probenmassen und relative Anteile der Protonen in den dynamisch unterscheidbaren Gruppen	79
6.1. Random-Walk-Simulationen: Parameter der verschiedenen Modelle . . .	126
7.1. Werte der Energiebarrierenverteilung für die Methylgruppen im Literaturvergleich.	148
7.2. Werte der Energiebarrierenverteilung für die Methylgruppen bei verschiedenen Versuchsfrequenzen.	149
7.3. Fitparameter aus Messungen des Hydratationswassers an Elastin	157

Literaturverzeichnis

- [1] A. Abragam. *Principles of Nuclear Magnetism (International Series of Monographs on Physics)*. Oxford University Press, reprint edition, 1983.
- [2] G. Adam and J. H. Gibbs. On the Temperature Dependence of Cooperative Relaxation Properties in Glass-Forming Liquids. *Journal of Chemical Physics*, 43(1):139–146, 1965.
- [3] N. Adir, Y. Dobrovetsky, and N. Lerner. Structure of c-phycocyanin from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus* at 2.5 Å: structural implications for thermal stability in phycobilisome assembly. *Journal of Molecular Biology*, 313(1):71–81, 2001.
- [4] N. Alberding, R. H. Austin, S. S. Chan, L. Eisenstein, H. Frauenfelder, I. C. Gunsalus, and T. M. Nordlund. Dynamics of carbon monoxide binding to protoheme. *Journal of Chemical Physics*, 65(11):4701–4711, 1976.
- [5] A. E. Aliev. Backbone dynamics in collagen. *Chemical Physics Letters*, 398(4-6):522–525, 2004.
- [6] C. B. Anfinsen. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181(4096):223–230, 1973.
- [7] A. Arbe, A. Alegría, J. Colmenero, S. Hoffmann, L. Willner, and D. Richter. Segmental Dynamics in Poly(vinylethylene)/Polyisoprene Miscible Blends Revisited. A Neutron Scattering and Broad-Band Dielectric Spectroscopy Investigation. *Macromolecules*, 32(22):7572–7581, 1999.
- [8] V. I. Arnold. *Catastrophe Theory*. Springer, 3rd edition, 2003.
- [9] R. H. Austin, K. W. Beeson, L. Eisenstein, H. Frauenfelder, and I. C. Gunsalus. Dynamics of ligand binding to myoglobin. *Biochemistry*, 14(24):5355–5373, 1975.
- [10] B. Bagchi. Water Dynamics in the Hydration Layer around Proteins and Micelles. *Chemical reviews*, 105:3197–3219, 2005.
- [11] J. R. Banavar, T. X. Hoang, and A. Maritan. Proteins and polymers. *Journal of Chemical Physics*, 122(23):234910, 2005.
- [12] E. Barkai, R. Metzler, and J. Klafter. From continuous time random walks to the fractional fokker-planck equation. *Physical Review E*, 61(1):132–138, 2000.

-
- [13] L. S. Batchelder, C. H. Niu, and D. A. Torchia. Methyl reorientation in polycrystalline amino acids and peptides: a deuteron NMR spin-lattice relaxation study. *Journal of the American Chemical Society*, 105(8):2228–2231, 1983.
- [14] H. Batzer and U. Kreibich. Influence of water on thermal transitions in natural polymers and synthetic polyamides. *Polymer Bulletin*, 5(11-12):585–590, 1981.
- [15] T. Becker, J. A. Hayward, J. L. Finney, R. M. Daniel, and J. C. Smith. Neutron Frequency Windows and the Protein Dynamical Transition. *Biophysical Journal*, 87(3):1436–1444, 2004.
- [16] M. Bée. *Quasielastic Neutron Scattering, Principles and Applications in Solid State Chemistry, Biology and Materials Science*. Taylor & Francis, 1. edition, 1988.
- [17] J. Behrendt. Molekulardynamiksimulation der Wasserdynamik in der Protein-wasserhülle. Bachelorarbeit, TU Darmstadt, 2009.
- [18] M. C. Bellissent-Funel, A. Filabozzi, and S. H. Chen. Measurement of coherent Debye-Waller factor in in vivo deuterated C-phycoerythrin by inelastic neutron scattering. *Biophysical journal*, 72(4):1792–1799, 1997.
- [19] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, and J. Hermans. *Interaction models for water in relation to protein hydration*, pages 331–334. Pullman, B., 1981.
- [20] R. Bergman. General susceptibility functions for relaxations in disordered systems. *Journal of Applied Physics*, 88(3):1356–1365, 2000.
- [21] L. Berthier and G. Tarjus. A critical test of the mode-coupling theory of the glass transition. *Physical Review E*, 82(3):031502, 2010.
- [22] K. Binder and W. Kob. *Glassy Materials and Disordered Solids: An Introduction to Their Statistical Mechanics*. World Scientific Publishing Company, 2005.
- [23] T. Blochowicz, A. Kudlik, S. Benkhof, J. Senker, E. Rössler, and G. Hinze. The spectral density in simple organic glass formers: Comparison of dielectric and spin-lattice relaxation. *Journal of Chemical Physics*, 110(24):12011–12022, 1999.
- [24] N. Bloembergen, E. Purcell, and R. Pound. Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption. *Physical Review*, 73(7):679–712, Apr. 1948.
- [25] D. Bock, R. Kahlau, B. Micko, B. Pötzschner, G. J. Schneider, and E. A. Rössler. On the cooperative nature of the β -process in neat and binary glasses: a dielectric and nuclear magnetic resonance spectroscopy study. *Journal of Chemical Physics*, 139(6), 2013.

-
-
- [26] R. Böhmer, R. V. Chamberlin, G. Diezemann, B. Geil, A. Heuer, G. Hinze, S. C. Kuebler, R. Richert, B. Schiener, H. Sillescu, H. W. Spiess, U. Tracht, and M. Wilhelm. Nature of the non-exponential primary relaxation in structural glass-formers probed by dynamically selective experiments. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 235-237:1–9, 1998.
- [27] R. Böhmer, G. Diezmann, G. Hinze, and E. Rössler. Dynamics of supercooled liquids and glassy solids. *Progress in NMR Spectroscopy*, 39:191–267, 2001.
- [28] S. Bone and R. Pethig. Dielectric Studies of Protein Hydration and Hydration-induced Flexibility. *Journal of Molecular Biology*, 181:323–326, 1985.
- [29] A. Bormuth. *Untersuchung der Polymerdynamik in Abhängigkeit von Kettenlänge, Temperatur und Druck mit Hilfe von Molekularodynamik Simulationen*. Dissertation, TU Darmstadt, 2012.
- [30] A. Bormuth, M. Hofmann, P. Henritzi, M. Vogel, and E. A. Rössler. Chain-Length Dependence of Polymer Dynamics: A Comparison of Results from Molecular Dynamics Simulations and Field-Cycling ^1H NMR. *Macromolecules*, 46(19):7805–7811, 2013.
- [31] I. Brovchenko, A. Krukau, N. Smolin, A. Oleinikova, A. Geiger, and R. Winter. Thermal breaking of spanning water networks in the hydration shell of proteins. *Journal of Chemical Physics*, 123:224905, 2005.
- [32] G. Caliskan, R. M. Briber, D. Thirumalai, V. Garcia-Sakai, S. A. Woodson, and A. P. Sokolov. Dynamic Transition in tRNA is Solvent Induced. *Journal of the American Chemical Society*, 128(1):32–33, 2005.
- [33] H. Cang, V. N. Novikov, and M. D. Fayer. Logarithmic decay of the orientational correlation function in supercooled liquids on the Ps to Ns time scale. *Journal of Chemical Physics*, 118(6):2800–2807, 2003.
- [34] S. Capaccioli, K. L. Ngai, S. Ancherbak, and A. Paciaroni. Evidence of Coexistence of Change of Caged Dynamics at T_g and the Dynamic Transition at T_d in Solvated Proteins. *Journal of Physical Chemistry B*, 116(6):1745–1757, 2012.
- [35] S. Capaccioli, K. L. Ngai, and N. Shinyashiki. The Johari-Goldstein β -relaxation of water. *Journal of Physical Chemistry B*, 111(28):8197–8209, 2007.
- [36] A. Cavagna. Supercooled Liquids for Pedestrians. *Physics Reports*, 476(4-6):51–124, 2009.
- [37] S. Cervený, A. Alegria, and J. Colmenero. Universal features of water dynamics in solutions of hydrophilic polymers, biopolymers, and small glass-forming materials. *Physical Review E*, 77:031803, 2008.
- [38] M. Chaplin. <http://www1.lsbu.ac.uk/water/index.html>, zuletzt besucht: 13.11.2014.

-
- [39] G. Chen, P. W. Fenimore, H. Frauenfelder, F. Mezei, J. Swenson, and R. D. Young. Protein fluctuations explored by inelastic neutron scattering and dielectric relaxation spectroscopy. *Philosophical Magazine*, 88(33-35):3877–3883, 2008.
- [40] S. H. Chen, L. Liu, E. Fratini, P. Baglioni, A. Faraone, and E. Mamontov. Observation of fragile-to-strong dynamic crossover in protein hydration water. *Proceedings of the National Academy*, 103(24):9012–9016, 2006.
- [41] X.-q. Chu, M. Lagi, E. Mamontov, E. Fratini, P. Baglioni, and S.-H. Chen. Experimental evidence of logarithmic relaxation in single-particle dynamics of hydrated protein molecules. *Soft Matter*, 6(12):2623–2627, 2010.
- [42] S. Cinelli, A. De Francesco, G. Onori, and A. Paciaroni. Thermal stability and internal dynamics of lysozyme as affected by hydration. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 6:3591–3595, 2004.
- [43] K. S. Cole and R. H. Cole. Dispersion and Absorption in Dielectrics I. Alternating Current Characteristics. *Journal of Chemical Physics*, 9(4):341–351, 1941.
- [44] J. Colmenero, A. J. Moreno, and A. Alegría. Neutron scattering investigations on methyl group dynamics in polymers. *Progress in Polymer Science*, 30(12):1147–1184, 2005.
- [45] S. Combet and J.-M. M. Zanotti. Further evidence that interfacial water is the main "driving force" of protein dynamics: a neutron scattering study on perdeuterated c-phycocyanin. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14(14):4927–4934, 2012.
- [46] S. Condamin, V. Tejedor, R. Voituriez, O. Bénichou, and J. Klafter. Probing microscopic origins of confined subdiffusion by first-passage observables. *Proceedings of the National Academy*, 105(15):5675–5680, 2008.
- [47] E. Cornicchi, M. Marconi, G. Onori, and A. Paciaroni. Controlling the protein dynamical transition with sugar-based bioprotectant matrices: A neutron scattering study. *Biophysical Journal*, 91(1):289–297, 2014.
- [48] H. L. Crespi, R. M. Rosenberg, and J. J. Katz. Proton Magnetic Resonance of Proteins Fully Deuterated except for ^1H -Leucine Side Chains. *Science*, 161(3843):795–796, 1968.
- [49] R. M. Daniel, R. V. Dunn, J. L. Finney, and J. C. Smith. The role of dynamics in enzyme activity. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 32:69–92, 2003.
- [50] L. David, A. Marx, and N. Adir. High-resolution crystal structures of trimeric and rod phycocyanin. *Journal of Molecular Biology*, 405(1):201–213, 2011.
- [51] D. W. Davidson and R. H. Cole. Dielectric Relaxation in Glycerol, Propylene Glycol, and n-Propanol. *Journal of Chemical Physics*, 19(12):1484–1490, 1951.

-
- [52] K. A. Dawson, G. Foffi, F. Sciortino, P. Tartaglia, and E. Zaccarelli. Mode-Coupling Theory of Colloids with Short-range Attractions. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 13(41):9113–9126, 2001.
- [53] L. Debelle, A. J. P. Alix, S. M. Wei, M.-P. Jacob, J.-P. Huvenne, M. Berjot, and P. Legrand. The secondary structure and architecture of human elastin. *European Journal of Biochemistry*, 258(2):533–539, 1998.
- [54] P. G. Debenedetti and F. H. Stillinger. Supercooled liquids and the glass transition. *Nature*, 410(6825):259–267, 2001.
- [55] P. Debnath, W. Min, X. S. Xie, and B. J. Cherayil. Multiple time scale dynamics of distance fluctuations in a semiflexible polymer: A one-dimensional generalized Langevin equation treatment. *Journal of Chemical Physics*, 123(20):204903, 2005.
- [56] S. Dellerue, A.-J. Petrescu, J. C. Smith, and M.-C. Bellissent-Funel. Radially Softening Diffusive Motions in a Globular Protein. *Biophysical Journal*, 81(3):1666–1676, 2001.
- [57] M. Doi and S. F. Edwards. *The Theory of Polymer Dynamics (International Series of Monographs on Physics)*. Oxford University Press, 1988.
- [58] W. Doster. The dynamical transition of proteins, concepts and misconceptions. *European Biophysics Journal*, 37(5):591–602, 2008.
- [59] W. Doster. The protein-solvent glass transition. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804:3–14, 2010.
- [60] W. Doster. The two-step scenario of the protein dynamical transition. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 357(2):622–628, 2011.
- [61] W. Doster, S. Busch, A. M. Gaspar, M. S. Appavou, J. Wuttke, and H. Scheer. Dynamical Transition of Protein-Hydration Water. *Physical Review Letters*, 104(9):098101, 2010.
- [62] W. Doster, S. Cusack, and W. Petry. Dynamical transition of myoglobin revealed by inelastic neutron scattering. *Nature*, 337:754–756, 1989.
- [63] W. Doster, S. Cusack, and W. Petry. Dynamic instability of liquidlike motions in a globular protein observed by inelastic neutron scattering. *Physical Review Letters*, 65(8):1080–1083, 1990.
- [64] W. Doster, H. Nakagawa, and M. S. Appavou. Scaling analysis of bio-molecular dynamics derived from elastic incoherent neutron scattering experiments. *Journal of Chemical Physics*, 139(4):045105, 2013.
- [65] W. Doster and M. Settles. Protein-water displacement distributions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1749(2):173–186, 2005.

-
- [66] M. D. Ediger, C. A. Angell, and S. R. Nagel. Supercooled Liquids and Glasses. *Journal Physical Chemistry*, 100(31):13200–13212, 1996.
- [67] M. D. Ediger and P. Harrowell. Perspective: Supercooled liquids and glasses. *Journal of Chemical Physics*, 137(8):080901, 2012.
- [68] S. W. Englander and N. R. Kallenbach. Hydrogen exchange and structural dynamics of proteins and nucleic acids. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 16:521–655, 1983.
- [69] M. B. Enright and D. M. Leitner. Mass fractal dimension and the compactness of proteins. *Physical Review E*, 71:011912, 2005.
- [70] U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, and L. G. Pedersen. A smooth particle mesh Ewald method. *Journal of Chemical Physics*, 103(19):8577–8593, 1995.
- [71] L. Fabbian, W. Götze, F. Sciortino, P. Tartaglia, and F. Thiery. Ideal glass-glass transitions and logarithmic decay of correlations in a simple system. *Physical Review E*, 59(2):R1347–R1350, 1999.
- [72] A. Faraone, L. Liu, C. Y. Mou, C. W. Yen, and S. H. Chen. Fragile-to-strong liquid transition in deeply supercooled confined water. *Journal of Chemical Physics*, 121(22):10843–10846, 2004.
- [73] P. W. Fenimore, H. Frauenfelder, B. H. McMahon, and F. G. Parak. Slaving: Solvent fluctuations dominate protein dynamics and functions. *Proceedings of the National Academy*, 99:16047–16051, 2002.
- [74] P. W. Fenimore, H. Frauenfelder, B. H. McMahon, and R. D. Young. Bulk-solvent and hydration-shell fluctuations, similar to α and β -fluctuations in glasses, control protein motions and functions. *Proceedings of the National Academy*, 101:14408–14413, 2004.
- [75] M. Ferrand, A. J. Dianoux, W. Petry, and G. Zaccaï. Thermal motions and function of bacteriorhodopsin in purple membranes: effects of temperature and hydration studied by neutron scattering. *Proceedings of the National Academy*, 90(20):9668–9672, 1993.
- [76] R. G. Fisher, N. E. Woods, H. E. Fuchs, and R. M. Sweet. Three-dimensional structures of C-phycoerythrin and B-phycoerythrin at 5-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 255(11):5082–5089, 1980.
- [77] H. Frauenfelder. Proteins, supercooled liquids, and glasses: A micro-review. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 42(3):662–665, 2010.
- [78] H. Frauenfelder, P. W. Fenimore, and B. H. McMahon. Protein folding is slaved to solvent motions. *Proceedings of the National Academy*, 103:15469–15472, 2006.

-
- [79] H. Frauenfelder, C. Guo, J. Berendszen, P. W. Fenimore, H. Jansson, B. H. McMahon, I. R. Stroe, J. Swenson, and D. Young. A unified model of protein dynamics. *Proceedings of the National Academy*, 106:5129–5134, 2009.
- [80] H. Frauenfelder, G. A. Petsko, and D. Tsernoglou. Temperature-dependent X-ray diffraction as a probe of protein structural dynamics. *Nature*, 280:558–563, 1979.
- [81] H. Frauenfelder, S. G. Sligar, and P. G. Wolynes. The energy landscape and motions of proteins. *Science*, 254:1498–1603, 1991.
- [82] B. Frick, J. Combet, and L. van Eijck. New possibilities with inelastic fixed window scans and linear motor Doppler drives on high resolution neutron backscattering spectrometers. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A*, 669:7–13, 2012.
- [83] B. Frick and D. Richter. The microscopic basis of the glass transition in polymers from neutron scattering studies. *Science*, 267(5206):1939–1945, 1995.
- [84] M. Fuchs, W. Götze, and M. Mayr. Asymptotic laws for tagged-particle motion in glassy systems. *Physical Review E*, 58(3):3384–3399, Sept. 1998.
- [85] E. Fukushima and S. B. W. Roeder. *Experimental Pulse NMR: A Nuts and Bolts Approach*. Westview Press, 1993.
- [86] F. Gabel and M.-C. Bellissent-Funel. C-Phycocyanin Hydration Water Dynamics in the Presence of Trehalose: An Incoherent Elastic Neutron Scattering Study at Different Energy Resolutions. *Biophysical Journal*, 92(11):4054–4063, 2007.
- [87] F. Gabel, D. Bicout, U. Lehnert, M. Tehei, M. Weik, and G. Zaccaï. Protein dynamics studied by neutron scattering. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 35(04):327–367, 2002.
- [88] A. Gädke, M. Rosenstihl, C. Schmitt, H. Stork, and N. Nestle. DAMARIS - A Flexible and Open Software Platform for NMR Spectrometer Control. *Diffusion Fundamentals*, 5(6):1, 2007.
- [89] C. Gainaru, A. Fillmer, and R. Böhmer. Dielectric Response of Deeply Supercooled Hydration Water in the Connective Tissue Proteins Collagen and Elastin. *Journal of Physical Chemistry B*, 113(38):12628–12631, 2009.
- [90] F.-X. Gallat, A. P. S. Brogan, Y. Fichou, N. McGrath, M. Moulin, M. Härtlein, J. Combet, J. Wuttke, S. Mann, G. Zaccaï, C. J. Jackson, A. W. Perriman, and M. Weik. A Polymer Surfactant Corona Dynamically Replaces Water in Solvent-Free Protein Liquids and Ensures Macromolecular Flexibility and Activity. *Journal of the American Chemical Society*, 134(32):13168–13171, 2012.
- [91] S. Genheden and U. Ryde. Will molecular dynamics simulations of proteins ever reach equilibrium? *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14(24):8662–8677, 2012.

-
- [92] W. G. Glöckle and T. F. Nonnenmacher. A fractional calculus approach to self-similar protein dynamics. *Biophysical Journal*, 68(1):46–53, 1995.
- [93] M. Goldstein. Viscous Liquids and the Glass Transition: A Potential Energy Barrier Picture. *Journal of Chemical Physics*, 51(9):3728–3739, 1969.
- [94] W. Götze and L. Sjogren. β relaxation near glass transition singularities. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 1(26):4183, 1989.
- [95] W. Götze and L. Sjogren. Logarithmic decay laws in glassy systems. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 1(26):4203, 1989.
- [96] W. Götze and M. Sperl. Logarithmic relaxation in glass-forming systems. *Physical Review E*, 66(1):011405, 2002.
- [97] W. Götze and M. Sperl. Nearly Logarithmic Decay of Correlations in Glass-Forming Liquids. *Physical Review Letters*, 92(10), 2004.
- [98] I. Goychuk and P. Hänggi. Anomalous Escape Governed by Thermal $1/f$ Noise. *Physical Review Letters*, 99(20):200601, 2007.
- [99] R. Granek. Proteins as fractals: Role of the hydrodynamic interaction. *Physical Review E*, 83:020902, 2011.
- [100] R. Granek and J. Klafter. Fractons in Proteins: Can They Lead to Anomously Decaying Time Autocorrelations? *Physical Review Letters*, 95(9):098106, 2005.
- [101] H. H. Grapengeter, B. Alefeld, and R. Kosfeld. An investigation of micro-brownian motions in polydimethylsiloxane by complementary incoherent-neutron-scattering and nuclear-magnetic-resonance experiments below room temperature. *Colloid and Polymer Science*, 265(3):226–233, 1987.
- [102] L. Greenspan. Humidity Fixed Points of Binary Saturated Aqueous Solutions. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, 81(1):89–96, 1977.
- [103] K. Griebenow and A. M. Klibanov. Lyophilization-induced reversible changes in the secondary structure of proteins. *Proceedings of the National Academy*, 92(24):10969–10976, 1995.
- [104] R. C. Hardy and R. L. Cottingham. Viscosity of deuterium oxide and water in the range 5° to 125° C. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, 42(6):573, 1949.
- [105] J. A. Hayward, J. L. Finney, R. M. Daniel, and J. C. Smith. Molecular Dynamics Decomposition of Temperature-Dependent Elastic Neutron Scattering by a Protein Solution. *Biophysical Journal*, 85:679–685, 2003.
- [106] J. A. Hayward and J. C. Smith. Temperature Dependence of Protein Dynamics: Computer Simulation Analysis of Neutron Scattering Properties. *Biophysical Journal*, 82(3):1216–1225, 2002.

-
- [107] L. Heckmann. *Thermodynamik und Phasenverhalten einfacher Modelle für Wasser*. Dissertation, TU Darmstadt, 2013.
- [108] P. Heitjans and J. Kärger, editors. *Diffusion in Condensed Matter: Methods, Materials, Models*. Springer, 3rd ed. 2012 edition, 2012.
- [109] U. Hensen, F. Gräter, and R. H. Henchman. Macromolecular Entropy Can Be Accurately Computed from Force. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2014.
- [110] J. Hermans, H. J. C. Berendsen, W. F. Van Gunsteren, and J. P. M. Postma. A consistent empirical potential for water-protein interactions. *Biopolymers*, 23(8):1513–1518, 1984.
- [111] A. Herrmann, B. Kresse, J. Gmeiner, A. F. Privalov, D. Kruk, F. Fujara, and E. A. Rössler. Protracted Crossover to Reptation Dynamics: A Field Cycling ^1H NMR Study Including Extremely Low Frequencies. *Macromolecules*, 45(3):1408–1416, 2012.
- [112] A. Herrmann, B. Kresse, M. Wohlfahrt, I. Bauer, A. F. Privalov, D. Kruk, N. Fatkul'lin, F. Fujara, and E. A. Rössler. Mean Square Displacement and Reorientational Correlation Function in Entangled Polymer Melts Revealed by Field Cycling ^1H and ^2H NMR Relaxometry. *Macromolecules*, 45(16):6516–6526, 2012.
- [113] A. Heuer. Exploring the potential energy landscape of glass-forming systems: from inherent structures via metabasins to macroscopic transport. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 20(37):373101, 2008.
- [114] A. Heuer, M. Kunow, M. Vogel, and R. D. Banhatti. Backward correlations and dynamic heterogeneities: a computer study of ion dynamics. *Physical Review B*, 66:224201, 2002.
- [115] G. Höhne, W. F. Hemminger, and H. J. Flammersheim. *Differential Scanning Calorimetry*. Springer, softcover reprint of hardcover 2nd ed. 2003 edition, 2010.
- [116] L. Hong, D. C. Glass, J. D. Nickels, S. Perticaroli, Z. Yi, M. Tyagi, H. O'Neill, Q. Zhang, A. P. Sokolov, and J. C. Smith. Elastic and Conformational Softness of a Globular Protein. *Physical Review Letters*, 110:028104, 2013.
- [117] W. G. Hoover. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Physical Review A*, 31(3):1695–1697, 1985.
- [118] E. C. Howard, K. Lindahl, C. Polnaszek, and D. D. Thomas. Simulation of saturation transfer electron paramagnetic motion with restricted angular amplitude. *Biophysical Journal*, 64:581, 1993.
- [119] O. W. Howarth. Effect of internal librational motions on the ^{13}C nuclear magnetic resonance relaxation times of proteins and peptides. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 74:1031–1041, 1978.

-
- [120] O. W. Howarth. Effect of internal librational motions of the ^{13}C nuclear magnetic resonance relaxation times of polymers and peptides. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2*, 75:863–873, 1979.
- [121] I. E. T. Iben, D. Braunstein, W. Doster, H. Frauenfelder, M. K. Hong, J. B. Johnson, S. Luck, P. Ormos, A. Schulte, P. J. Steinbach, A. H. Xie, and R. D. Young. Glassy behavior of a protein. *Physical Review Letters*, 62:1916, 1989.
- [122] B. Jana, S. Pal, and B. Bagchi. Hydrogen Bond Breaking Mechanism and Water Reorientational Dynamics in the Hydration Layer of Lysozyme. *Journal of Physical Chemistry B*, 112:9112–9117, 2008.
- [123] H. Jansson and J. Swenson. The protein glass transition as measured by dielectric spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804:20–26, 2010.
- [124] A. Janz. Molekulardynamik-Simulationen an Wasser-Peptid-Systemen des Peptids VPGVG zur Untersuchung der Struktur-Dynamik-Beziehung. Masterarbeit, TU Darmstadt, 2012.
- [125] W. L. Jorgensen and J. D. Madura. Temperature and size dependence for Monte Carlo simulations of TIP4P water. *Molecular Physics*, 56(6):1381–1392, 1985.
- [126] W. L. Jorgensen, D. S. Maxwell, and J. Tirado-Rives. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 118(45):11225–11236, 1996.
- [127] W. L. Jorgensen and J. Tirado-Rives. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. *Journal of the American Chemical Society*, 110(6):1657–1666, 1988.
- [128] G. S. Kachalova, A. N. Popov, and H. D. Bartunik. A steric mechanism for inhibition of CO binding to heme proteins. *Science*, 284(5413):473–476, 1999.
- [129] S. R. Kakivaya and C. A. Hoeve. The glass point of elastin. *Proceedings of the National Academy*, 72(9):3505–3507, 1975.
- [130] K. Kämpf, F. Klameth, and M. Vogel. Power-law and logarithmic relaxations of hydrated proteins: A molecular dynamics simulations study. *Journal of Chemical Physics*, 137(20):205105, 2012.
- [131] K. Kämpf, B. Kremmling, and M. Vogel. Vanishing amplitude of backbone dynamics causes a true protein dynamical transition: ^2H NMR studies on perdeuterated C-phycocyanin. *Physical Review E*, 89(3), 2014.
- [132] M. Karplus and J. A. McCammon. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature Structural & Molecular Biology*, 9(9):646–652, 2002.

-
- [133] M. Karplus and G. A. Petsko. Molecular dynamics simulations in biology. *Nature*, 347(6294):631–639, 1990.
- [134] J. C. Kendrew, G. Bodo, H. M. Dintzis, R. G. Parrish, H. Wyckoff, and D. C. Phillips. A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis. *Nature*, 181(4610):662–666, 1958.
- [135] B. S. Khatri and T. C. B. McLeish. Rouse Model with Internal Friction: A Coarse Grained Framework for Single Biopolymer Dynamics. *Macromolecules*, 40(18):6770–6777, 2007.
- [136] S. Khodadadi, S. Pawlus, and A. P. Sokolov. Influence of Hydration on Protein Dynamics: Combining Dielectric and Neutron Scattering Spectroscopy Data. *Journal of Physical Chemistry B*, 112(45):14273–14280, 2008.
- [137] S. Khodadadi, J. H. Roh, A. Kisliuk, E. Mamontov, M. Tyagi, S. A. Woodson, R. M. Briber, and A. P. Sokolov. Dynamics of Biological Macromolecules: Not a Simple Slaving by Hydration Water. *Biophysical Journal*, 98(7):1321–1326, 2010.
- [138] O. Kirstein, M. Prager, T. Kozielski, and D. Richter. Phase space transformation used at the FRM II backscattering spectrometer: concepts and technical realization. *Physica B: Condensed Matter*, 283(4):361–364, 2000.
- [139] F. Klameth. Untersuchungen zu Myoglobin in Confinement mittels molekuldynamischen Simulationen. Masterarbeit, TU Darmstadt, 2011.
- [140] F. Klameth and M. Vogel. Structure and dynamics of supercooled water in neutral confinements. *Journal of Chemical Physics*, 138(13):134503, 2013.
- [141] G. R. Kneller. Stochastic dynamics and relaxation in simple liquids and proteins - brownian dynamics and beyond - Vorlesungsskript.
- [142] G. R. Kneller. Quasielastic neutron scattering and relaxation processes in proteins: analytical and simulation-based models. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 7(13):2641–2655, 2005.
- [143] W. Kob. The Mode-Coupling Theory of the Glass Transition. *Condensed Matter - Statistical Mechanics*, 1997.
- [144] W. Köhler, J. Friedrich, R. Fischer, and H. Scheer. An optical linewidth study of a chromoprotein: C-phycocyanin in a low temperature glass. *Chemical Physics Letters*, 146(3-4):280–282, 1988.
- [145] W. Köhler, J. Friedrich, R. Fischer, and H. Scheer. High resolution frequency selective photochemistry of phycobilisomes at cryogenic temperatures. *Journal of Chemical Physics*, 89(2):871–874, 1988.

-
-
- [146] S. C. Kou and X. S. Xie. Generalized Langevin Equation with Fractional Gaussian Noise: Subdiffusion within a Single Protein Molecule. *Physical Review Letters*, 93(18):180603, 2004.
- [147] B. Kremmling. ^2H -NMR-Untersuchungen der Dynamik von C-Phycocyanin. Masterarbeit, TU Darmstadt, 2011.
- [148] M. Krishnan, V. Kurkal-Siebert, and J. C. Smith. Methyl Group Dynamics and the Onset of Anharmonicity in Myoglobin. *Journal of Physical Chemistry B*, 112:5522–5533, 2008.
- [149] A. Krushelnitsky and D. Reichert. Solid-state NMR and protein dynamics. *Progress in NMR Spectroscopy*, 47:1–25, 2005.
- [150] R. Kubo. The fluctuation-dissipation theorem. *Reports on Progress in Physics*, 29(1):255–284, 1966.
- [151] U. Kucich, J. Rosenbloom, P. Kimbel, G. Weinbaum, and W. R. Abrams. Size Distribution of Human Lung Elastin-derived Peptide Antigens Generated In Vitro and In Vivo. *American Review of Respiratory Disease*, 143(2):279–283, 1991.
- [152] P. Kumar, Z. Yan, L. Xu, M. G. Mazza, S. V. Buldyrev, S. H. Chen, S. Sastry, and H. E. Stanley. Glass Transition in Biomolecules and the Liquid-Liquid Critical Point of Water. *Physical Review Letters*, 97:177802, 2006.
- [153] V. Kurkal, R. M. Daniel, J. L. Finney, M. Tehei, R. V. Dunn, and J. C. Smith. Enzyme Activity and Flexibility at Very Low Hydration. *Biophysical Journal*, 89(2):1282–1287, 2005.
- [154] A. Kyritsis, A. Panagopoulou, P. Pissis, R. i Serra, J. L. Gomez Ribelles, and N. Shinyashiki. Water and protein dynamics in protein - Water mixtures over wide ranges of composition. In *Electrets (ISE), 2011 14th International Symposium on*, pages 49–50. IEEE, 2011.
- [155] D. Laage and W. H. Thompson. Reorientation dynamics of nanoconfined water: Power-law decay, hydrogen-bond jumps, and test of a two-state model. *Journal of Chemical Physics*, 136(4):044513, 2012.
- [156] M. Lagi, P. Baglioni, and S. H. Chen. Logarithmic Decay in Single-Particle Relaxation of Hydrated Lysozyme Powder. *Physical Review Letters*, 103(10):108102, 2009.
- [157] R. E. Lechner and S. Longeville. Quasielastic Neutron Scattering in Biology, Part I: Methods. In *Neutron Scattering in Biology, Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering*, pages 309–354. Springer Berlin Heidelberg, 2006.
- [158] A. L. Lee and J. Wand. Microscopic origins of entropy, heat capacity and the glass transition in proteins. *Nature*, 411:501–504, 2001.

-
- [159] C. Lee, S. H. Park, M. Y. Lee, and M. H. Yu. Regulation of protein function by native metastability. *Proceedings of the National Academy*, 97(14):7727–7731, 2000.
- [160] U. Lehnert, V. Réat, M. Weik, G. Zaccai, and C. Pfister. Thermal Motions in Bacteriorhodopsin at Different Hydration Levels Studied by Neutron Scattering: Correlation with Kinetics and Light-Induced Conformational Changes. *Biophysical Journal*, 75(4):1945–1952, 2014.
- [161] M. H. Levitt. *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*. Wiley, 2 edition, 2008.
- [162] B. Li, D. O. V. Alonso, B. J. Bennion, and V. Daggett. Hydrophobic Hydration is an Important source of elasticity in Elastin-Based Biopolymers. *Journal of the American Chemical Society*, 123:11991, 2001.
- [163] H. Lichtenegger, W. Doster, T. Kleinert, A. Birk, B. Sepiol, and G. Vogl. Heme-Solvent Coupling: A Mössbauer Study of Myoglobin in Sucrose. *Biophysical Journal*, 76(1):414–422, 2014.
- [164] C. P. Lindsey and G. D. Patterson. Detailed comparison of the Williams-Watts and Cole-Davidson functions. *Journal of Chemical Physics*, 73(7):3348–3357, 1980.
- [165] G. Lipari and A. Szabo. Effect of librational motion on fluorescence depolarization and nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules and membranes. *Biophysical Journal*, 30(3):489–506, 1980.
- [166] G. Lipari and A. Szabo. Pade approximants to correlation functions for restricted rotational diffusion. *Journal of Chemical Physics*, 75(6):2971–2976, 1981.
- [167] G. Lipari and A. Szabo. Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity. *Journal of the American Chemical Society*, 104(17):4546–4559, 1982.
- [168] D. Liu, X. Chu, M. Lagi, Y. Thang, E. Fratini, P. Baglioni, A. Alatas, A. Said, E. Alp, and S. H. Chen. Studies of Phonon-like low-energy excitations of protein Molecules by Inelastic X-Ray scattering. *Physical Review Letters*, 101:135501, 2008.
- [169] L. Liu, S.-H. Chen, A. Faraone, C.-W. Yen, and C.-Y. Mou. Pressure Dependence of Fragile-to-Strong Transition and a Possible Second Critical Point in Supercooled Confined Water. *Physical Review Letters*, 95(11):117802, 2005.
- [170] S. W. Lovesey. *The Theory of Neutron Scattering from Condensed Matter: Volume I (International Series of Monographs on Physics)*. Oxford University Press, USA, 1986.
- [171] V. Lubchenko and P. G. Wolynes. Theory of Structural Glasses and Supercooled Liquids. *Annual Review of Physical Chemistry*, 58(1):235–266, 2007.

-
-
- [172] S. A. Lusceac. *Study of relaxation processes in simple glass formers by means of ^2H NMR spectroscopy*. Dissertation, Universität Bayreuth, 2005.
- [173] S. A. Lusceac, M. Rosenstihl, M. Vogel, C. Gainaru, A. Fillmer, and R. Böhmer. NMR and dielectric studies of hydrated collagen and elastin: Evidence for a delocalized secondary relaxation. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 357:655–663, 2010.
- [174] S. A. Lusceac and M. Vogel. ^2H NMR Study of the Water Dynamics in Hydrated Myoglobin. *Journal of Physical Chemistry B*, 114:10209–10216, 2010.
- [175] S. A. Lusceac, M. R. Vogel, and C. R. Herbers. ^2H and ^{13}C NMR studies on the temperature-dependent water and protein dynamics in hydrated elastin, myoglobin and collagen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1804(1):41–48, 2010.
- [176] J. W. Mack, M. G. Usha, J. Long, R. G. Griffin, and R. J. Wittebort. Backbone motions in a crystalline protein from field-dependent ^2H -NMR relaxation and line-shape analysis. *Biopolymers*, 53(1):9–18, 2000.
- [177] S. Magazù, F. Migliardo, and A. Benedetto. Mean Square Displacements from Elastic Incoherent Neutron Scattering Evaluated by Spectrometers Working with Different Energy Resolution on Dry and Hydrated (H_2O and D_2O) Lysozyme. *Journal of Physical Chemistry B*, 114(28):9268–9274, 2010.
- [178] S. Magazù, F. Migliardo, and A. Benedetto. Puzzle of Protein Dynamical Transition. *Journal of Physical Chemistry B*, 115(24):7736–7743, 2011.
- [179] F. Mallamace, M. Broccio, C. Corsaro, A. Faraone, U. Wanderlingh, L. Liu, C. Y. Mou, and S. H. Chen. The fragile-to-strong dynamic crossover transition in confined water: nuclear magnetic resonance results. *Journal of Chemical Physics*, 124(16):161102, 2006.
- [180] F. Mallamace, S.-H. Chen, M. Broccio, C. Corsaro, V. Crupi, D. Majolino, V. Venuti, P. Baglioni, E. Fratini, C. Vannucci, and H. E. Stanley. Role of the solvent in the dynamical transitions of proteins: the case of the lysozyme-water system. *Journal of Chemical Physics*, 127(4), 2007.
- [181] F. Mallamace, C. Corsaro, P. Baglioni, E. Fratini, and S.-H. Chen. The dynamical crossover phenomenon in bulk water, confined water and protein hydration water. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 24(6):064103, 2012.
- [182] N. H. March and M. P. Tosi. *Introduction to Liquid State Physics*. World Scientific Publishing Company, 1st edition, 2002.
- [183] R. Metzler, E. Barkai, and J. Klafter. Anomalous Diffusion and Relaxation Close to Thermal Equilibrium: A Fractional Fokker-Planck Equation Approach. *Physical Review Letters*, 82(18):3563–3567, 1999.

-
- [184] R. Metzler and J. Klafter. The random walk's guide to anomalous diffusion: a fractional dynamics approach. *Physics Reports*, 339(1):1–77, 2000.
- [185] W. Min, B. P. English, G. Luo, B. J. Cherayil, S. C. Kou, and X. S. Xie. Fluctuating Enzymes: Lessons from Single-Molecule Studies. *Accounts of Chemical Research*, 38(12):923–931, 2005.
- [186] W. Min, G. Luo, B. J. Cherayil, S. C. Kou, and X. S. Xie. Observation of a Power-Law Memory Kernel for Fluctuations within a Single Protein Molecule. *Physical Review Letters*, 94(19):198302, 2005.
- [187] A. P. Minton. Models for excluded volume interaction between an unfolded protein and rigid macromolecular cosolutes: macromolecular crowding and protein stability revisited. *Biophysical journal*, 88(2):971–985, 2005.
- [188] O. Mishima and H. E. Stanley. The relationship between liquid, supercooled and glassy water. *Nature*, 396(6709):329–335, 1998.
- [189] A. J. Moreno and J. Colmenero. Is there a higher-order mode coupling transition in polymer blends? *Journal of Chemical Physics*, 124(18):184906, 2006.
- [190] V. N. Morozov and S. G. Gevorgian. Low-Temperature Glass Transition in Proteins. *Biopolymers*, 24:1785–1799, 1985.
- [191] T. Neusius, I. Daidone, I. M. Sokolov, and J. C. Smith. Subdiffusion in Peptides Originates from the Fractal-Like Structure of Configuration Space. *Physical Review Letters*, 100(18):188103, 2008.
- [192] T. Neusius, I. Daidone, I. M. Sokolov, and J. C. Smith. Configurational subdiffusion of peptides: A network study. *Physical Review E*, 83(2):021902, 2011.
- [193] K. L. Ngai. Relation between some secondary relaxations and the alpha relaxations in glass-forming materials according to the coupling model. *Journal of Chemical Physics*, 109(16):6982–6994, 1998.
- [194] K. L. Ngai. Dynamic and thermodynamic properties of glass-forming substances. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 275(1-2):7–51, 2000.
- [195] K. L. Ngai, S. Capaccioli, and A. Paciaroni. Nature of the water specific relaxation in hydrated proteins and aqueous mixtures. *Chemical Physics*, 424:37–44, 2013.
- [196] K. L. Ngai and M. Paluch. Classification of secondary relaxation in glass-formers based on dynamic properties. *Journal of Chemical Physics*, 120(2):857–873, 2004.
- [197] J. D. Nickels, H. O'Neill, L. Hong, M. Tyagi, G. Ehlers, K. L. Weiss, Q. Zhang, Z. Yi, E. Mamontov, J. C. Smith, and A. P. Sokolov. Dynamics of protein and its hydration water: neutron scattering studies on fully deuterated GFP. *Biophysical journal*, 103(7):1566–1575, 2012.

-
-
- [198] F. Noack. Nuclear Magnetic Relaxation Spectroscopy. In P. Diehl, E. Fluck, and R. Kosfeld, editors, *NMR*, volume 3 of *NMR*, pages 83–144. Springer Berlin Heidelberg, 1971.
- [199] S. Nosé. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Molecular Physics*, 52(2):255–268, 1984.
- [200] C. Oostenbrink, A. Villa, A. E. Mark, and W. F. Van Gunsteren. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13):1656–1676, 2004.
- [201] P. M. Ossi. *Disordered Materials: An Introduction*. Springer, 2nd ed. 2006 edition, 2012.
- [202] A. Paciaroni, S. Cinelli, and G. Onori. Effect of the environment on the protein dynamical transition: a neutron scattering study. *Biophysical journal*, 83(2):1157–1164, 2002.
- [203] A. Paciaroni, E. Cornicchi, A. Francesco, M. Marconi, and G. Onori. Conditioning action of the environment on the protein dynamics studied through elastic neutron scattering. *European Biophysics Journal*, 35(7):591–599, 2006.
- [204] A. Paciaroni, E. Cornicchi, M. Marconi, A. Orecchini, C. Petrillo, M. Haertlein, M. Moulin, and F. Sacchetti. Coupled relaxations at the protein-water interface in the picosecond time scale. *Journal of The Royal Society Interface*, 6(Suppl 5):S635–S640, 2009.
- [205] A. Panagopoulou, A. Kyritsis, R. Sabater I Serra, J. L. Gómez Ribelles, N. Shinyashiki, and P. Pissis. Glass transition and dynamics in BSA-water mixtures over wide ranges of composition studied by thermal and dielectric techniques. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1814(12):1984–1996, 2011.
- [206] D. Panja. Anomalous Polymer Dynamics Is Non-Markovian: Memory Effects and The Generalized Langevin Equation Formulation. *Journal of Statistical Mechanics*, 2010:P06011, 2010.
- [207] M. J. Parker and A. R. Clarke. Amide Backbone and Water-Related H/D Isotope Effects on the Dynamics of a Protein Folding Reaction. *Biochemistry*, 36(19):5786–5794, 1997.
- [208] M. Parrinello and A. Rahman. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics*, 52(12):7182–7190, 1981.
- [209] S. Pawlus, S. Khodadadi, and A. P. Sokolov. Conductivity in Hydrated Proteins: No Signs of the Fragile-to-Strong Crossover. *Physical Review Letters*, 100:108103, 2008.

-
- [210] A. Perry, M. P. Stypa, B. T. Tenn, and K. K. Kumashirp. Solid-State ^{13}C -NMR Reveals Effects of Temperature and Hydration on Elastin. *Biophysical Journal*, 82:1086, 2002.
- [211] F. Pizzitutti, M. Marchi, F. Sterpone, and P. J. Rossky. How Protein Surfaces Induce Anomalous Dynamics of Hydration Water. *Journal of Physical Chemistry B*, 111:7584–7590, 2007.
- [212] V. V. Ponkratov, J. Friedrich, and J. M. Vanderkooi. Hole burning experiments with proteins: Relaxations, fluctuations and glass-like features. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 352:4379–4386, 2006.
- [213] P. H. Poole, F. Sciortino, U. Essmann, and H. E. Stanley. Phase behaviour of metastable water. *Nature*, 360(6402):324–328, 1992.
- [214] W. Press. Single-particle rotations in molecular crystals. In *Single-particle rotations in molecular crystals*, volume 92 of *Springer Tracts in Modern Physics*, pages 1–126. Springer Berlin Heidelberg, 1981.
- [215] B. F. Rasmussen, A. M. Stock, D. Ringe, and G. A. Petsko. Crystalline ribonuclease A loses function below the dynamical transition at 220 K. *Nature*, 357:423–424, 1992.
- [216] K. D. Rector, J. R. Engholm, C. W. Rella, J. R. Hill, D. D. Dlott, and M. D. Fayer. A Dynamical Transition in the Protein Myoglobin Observed by Infrared Vibrational Echo Experiments. *Journal Physical Chemistry A*, 103(14):2381–2387, 1999.
- [217] Reichert. A solid-state NMR study of the fast and slow dynamics of collagen fibrils at varying hydration levels. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 42:276–284, 2004.
- [218] D. R. Reichman and P. Charbonneau. Mode-coupling theory. *Journal of Statistical Mechanics*, 2005(05):P05013, 2005.
- [219] R. Richert. Heterogeneous dynamics in liquids: fluctuations in space and time. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 14(23):R703–R738, 2002.
- [220] D. Ringe and G. A. Petsko. The ‘glass transition’ in protein dynamics: what it is, why it occurs, and how to exploit it. *Biophysical Chemistry*, 105(2-3):667–680, 2003.
- [221] J. H. Roh, J. E. Curtis, S. Azzam, V. N. Novikov, I. Peral, Z. Chowdhuri, R. B. Gregory, and A. P. Solokov. Influence of Hydration on the Dynamics of Lysozyme. *Biophysical Journal*, 91:2573, 2006.
- [222] J. H. Roh, V. N. Novikov, R. B. Gregory, J. E. Curtis, Z. Chowdhuri, and A. P. Sokolov. Onsets of Anharmonicity in Protein Dynamics. *Physical Review Letters*, 95(3):038101, 2005.

-
- [223] M. Rosenstihl. *Untersuchung der Translationsdynamik von Wasser in Proteinmatrizen mit Hilfe von Feldgradienten-NMR*. Dissertation, TU Darmstadt, 2012.
- [224] M. Rosenstihl, K. Kämpf, F. Klameth, M. Sattig, and M. Vogel. Water Dynamics at Rough Interfaces. July 2014.
- [225] M. Rosenstihl and M. Vogel. Static and pulsed field gradient nuclear magnetic resonance studies of water diffusion in protein matrices. *Journal of Chemical Physics*, 135(16):164503, 2011.
- [226] E. A. Rössler, S. Stapf, and N. Fatkullin. Recent NMR investigations on molecular dynamics of polymer melts in bulk and in confinement. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 18(3):173–182, 2013.
- [227] J. Rupley and G. Careri. *Protein Hydration and Function*, volume 41 of *Advances in Protein Chemistry*, pages 37–172. Elsevier, 1991.
- [228] A. Sachdeva and S. Cai. Structural Differences of Proteins Between Solution State and Solid State Probed by Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 63(4):458–464, 2009.
- [229] V. Samouillan, C. Andre, J. Dandurand, and C. Lacabanne. Effect of Water on the Molecular Mobility of Elastin. *Biomacromolecules*, 5:958–964, 2004.
- [230] G. Sartor, E. Mayer, and G. P. Johari. Calorimetric studies of the kinetic unfreezing of molecular motions in hydrated lysozyme, hemoglobin, and myoglobin. *Biophysical Journal*, 66(1):249–258, 1994.
- [231] M. Sattig. ^2H -NMR study on the dynamical behaviour of heavy water in hard confinement. Masterarbeit, TU Darmstadt, 2012.
- [232] M. Sattig and M. Vogel. Dynamic Crossovers and Stepwise Solidification of Confined Water: A ^2H NMR Study. *Journal Physical Chemistry Letters*, 5(1):174–178, 2014.
- [233] S. K. Schiferl and D. C. Wallace. Statistical errors in molecular dynamics averages. *Journal of Chemical Physics*, 83:5203–5209, 1985.
- [234] G. Schirò, C. Caronna, F. Natali, and A. Cupane. Direct Evidence of the Amino Acid Side Chain and Backbone Contributions to Protein Anharmonicity. *Journal of the American Chemical Society*, 132(4):1371–1376, 2010.
- [235] G. Schirò, A. Cupane, E. Vitrano, and F. Bruni. Dielectric Relaxations in Confined Hydrated Myoglobin. *Journal of Physical Chemistry B*, 113(28):9606–9613, 2009.
- [236] G. Schirò, M. Fomina, and A. Cupane. Communication: Protein dynamical transition vs. liquid-liquid phase transition in protein hydration water. *Journal of Chemical Physics*, 139(12):121102, 2013.

-
- [237] C. Schmelzer. *Massenspektrometrische Charakterisierung von Proteinhydrolysaten: Verdaustudien an β -Casein und Strukturuntersuchungen an Elastin*. Dissertation, Martin-Luther-Universität-Halle-Wittenberg, 2007.
- [238] B. Schmid and R. Schilling. Glass transition of hard spheres in high dimensions. *Physical Review E*, 81(4), 2010.
- [239] K. Schmidt-Rohr and H. W. Spiess. *Multidimensional Solid-state NMR and Polymers*. Academic Press, London, 1994.
- [240] S. Schneider. Untersuchung der anomalen intramolekularen Diffusion in Proteinen unter Zuhilfenahme fraktionaler Infinitesimalrechnung und molekulardynamischer Simulationen. Bachelorarbeit, TU Darmstadt, 2014.
- [241] F. Sciortino, P. Tartaglia, and E. Zaccarelli. Evidence of a Higher-Order Singularity in Dense Short-Ranged Attractive Colloids. *Physical Review Letters*, 91(26):268301, 2003.
- [242] P. Senet, G. G. Maisuradze, C. Foulie, P. Delarue, and H. A. Scheraga. How main-chains of proteins explore the free-energy landscape in native states. *Proceedings of the National Academy*, 105(50):19708–19713, 2008.
- [243] M. Settles and W. Doster. Anomalous diffusion of adsorbed water: A neutron scattering study of hydrated myoglobin. *Faraday Discussions*, 103:269–279, 1996.
- [244] G. P. Singh, H. J. Schink, H. v. Löhneysen, F. Parak, and S. Hunklinger. Excitations in Metmyoglobin crystals at low temperatures. *Zeitschrift für Physik B Condensed Matter*, 55(1):23–26, 1984.
- [245] J. C. Smith, F. Merzel, A. Bondar, and S. Fischer. Structure, dynamics and reactions of protein hydration water. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 359:1181–1190, 2004.
- [246] A. P. Sokolov, H. Grimm, and R. Kahn. Glassy dynamics in DNA: Ruled by water of hydration? *Journal of Chemical Physics*, 110(14):7053–7057, 1999.
- [247] A. M. Sophocleous, J. Zhang, and E. M. Topp. Localized hydration in lyophilized myoglobin by hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry. 1. Exchange mapping. *Molecular Pharmaceutics*, 9(4):718–726, 2012.
- [248] M. Sperl. Logarithmic relaxation in a colloidal system. *Physical Review E*, 68(3):031405, 2003.
- [249] M. Sperl. Cole-Cole law for critical dynamics in glass-forming liquids. *Physical Review E*, 74:011503, 2006.
- [250] A. Steigel and H. W. Spiess. *Dynamic NMR Spectroscopy (NMR Basic Principles and Progress)*. Springer, softcover reprint of the original 1st ed. 1978 edition, 2011.

-
-
- [251] K. Stroh. Vom Protein zum Polymer - Molekulardynamiksimulationen von Kettenmolekülen. Bachelorarbeit, TU Darmstadt, 2013.
- [252] M. Tarek and D. J. Tobias. The Dynamics of Protein Hydration Water: A Quantitative Comparison of Molecular Dynamics Simulations and Neutron-scattering Experiments. *Biophysical Journal*, 79:3244–3257, 2000.
- [253] M. Tarek and D. J. Tobias. Role of Protein-Water Hydrogen Bond Dynamics in the Protein Dynamical Transition. *Physical Review Letters*, 88(13):138101, 2002.
- [254] M. Tarek and D. J. Tobias. The role of protein-solvent hydrogen bond dynamics in the structural relaxation of a protein in glycerol versus water. *European Biophysics Journal*, 37:701–709, 2008.
- [255] K. Teilum, J. G. Olsen, and B. B. Kragelung. Functional aspects of protein flexibility. *Cellular and Molecular Life Science*, 66:2231–2247, 2009.
- [256] M. T. F. Telling, L. Clifton, J. Combet, B. Frick, S. Howells, and V. G. Sakai. Lyophilised protein dynamics: more than just methyls? *Soft Matter*, 8(37):9529–9532, 2012.
- [257] D. Thirumalai and G. Reddy. Protein thermodynamics: Are native proteins metastable? *Nature Chemistry*, 3(12):910–911, 2011.
- [258] D. A. Torchia and A. Szabo. Spin-lattice relaxation in solids. *Journal of Magnetic Resonance*, 49(1):107–121, 1982.
- [259] A. L. Tournier, J. Xu, and J. C. Smith. Translational Hydration Water Dynamics Drives the Protein Glass Transition. *Biophysical Journal*, 85:1871–1875, 2003.
- [260] A. Triolo, O. Russina, C. Hardacre, M. Nieuwenhuyzen, M. A. Gonzalez, and H. Grimm. Relaxation Processes in Room Temperature Ionic Liquids: The Case of 1-Butyl-3-Methyl Imidazolium Hexafluorophosphate. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(46):22061–22066, 2005.
- [261] A. M. Tsai, D. A. Neumann, and L. N. Bell. Molecular Dynamics of Solid-State Lysozyme as Affected by Glycerol and Water: A Neutron Scattering Study. *Biophysical Journal*, 79:2728–2732, 2000.
- [262] J. L. Tymoczko. *Biochemie (German Edition)*. Spektrum-Akademischer Verlag, 2003.
- [263] D. W. Urry, T. Hugel, M. Seitz, H. E. Gaub, L. Sheiba, J. Dea, J. Xu, and T. Parker. Elastin: a representative ideal protein elastomer. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 357(1418):169–184, 2002.
- [264] D. W. Urry, T. L. Trapane, M. Iqbal, C. M. Venkatachalam, and K. U. Prasad. Carbon-13 NMR relaxation studies demonstrate an inverse temperature transition in the elastin polypentapeptide. *Biochemistry*, 24(19):5182–5189, 1985.

-
- [265] D. van der Spoel, E. Lindahl, A. Hess, A. R. van Buuren, E. Apol, P. J. Meulenhoff, D. P. Tieleman, A. L. T. M. Sijbers, K. A. Feenstra, R. van Drunen, and H. J. C. Berendsen. Gromacs User Manual version 4.5.4. 2010.
- [266] W. F. van Gunsteren, D. Bakowies, R. Baron, I. Chandrasekhar, M. Christen, X. Daeu, P. Gee, D. P. Geerke, A. Glättli, P. H. Hünenberger, K. M. A., C. Oostenbrink, M. Schenk, D. Trzesniak, N. F. A. van der Vegt, and H. B. Yu. Biomolekulare Modellierung: Ziele, Probleme, Perspektiven. *Angewandte Chemie*, 118:4168–4198, 2006.
- [267] D. Vitkup, D. Ringe, G. A. Petsko, and M. Karplus. Solvent mobility and the protein 'glass' transition. *Nature Structural & Molecular Biology*, 7(1):34–38, 2000.
- [268] Vogel. Ion and polymer dynamics in polymer electrolytes PPO-LiClO₄. I. Insights from NMR line-shape analysis. *Journal of Chemical Physics*, 125:054905, 2006.
- [269] M. Vogel. *²H-NMR Untersuchung der Sekundärrelaxation in organischen Glasbildnern*. Dissertation, Universität Bayreuth, 2000.
- [270] M. Vogel. Origins of Apparent Fragile-to-Strong Transitions of Protein Hydration Waters. *Physical Review Letters*, 101:225701, 2008.
- [271] M. Vogel. Temperature-Dependent Mechanisms for the Dynamics of Protein-Hydration Waters: A Molecular Dynamics Simulation Study. *Journal of Physical Chemistry B*, 113:9386–9392, 2009.
- [272] M. Vogel and E. Rössler. Effects of Various Types of Molecular Dynamics on 1D and 2D ²H NMR Studied by Random Walk Simulations. *Journal of Magnetic Resonance*, 147(1):43–58, 2000.
- [273] M. Vogel and E. Rössler. On the Nature of Slow β Process in Simple Glass Formers: A ²H NMR Study. *Journal of Physical Chemistry B*, 104(18):4285–4287, 2000.
- [274] M. Vogel and E. Rössler. Slow β process in simple organic glass formers studied by one- and two-dimensional ²H nuclear magnetic resonance. I. *Journal of Chemical Physics*, 114:5802, 2001.
- [275] M. Vogel and E. Rössler. Slow β process in simple organic glass formers studied by one and two-dimensional ²H nuclear magnetic resonance. II. Discussion of motional models. *Journal of Chemical Physics*, 115:10883, 2001.
- [276] M. Vogel and T. Torbrügge. Nonexponential polymer segmental motion in the presence and absence of ions: ²H NMR multitime correlation functions for polymer electrolytes poly(propylene glycol)-LiClO₄. *Journal of Chemical Physics*, 126(20):204902, 2007.

-
-
- [277] L. Vugmeyster, D. Ostrovsky, K. Penland, G. L. Hoatson, and R. L. Vold. Glassy dynamics of protein methyl groups revealed by deutron NMR. *Journal of Physical Chemistry B*, 117(4):1051–1061, 2013.
- [278] H. Wagner and R. Richert. Spatial uniformity of the β -relaxation in D-sorbitol. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 242(1):19–24, 1998.
- [279] K. Weron and M. Kotulski. On the Cole-Cole relaxation function and related Mittag-Leffler distribution. *Physica A: Statistical and Theoretical Physics*, 232(1-2):180–188, 1996.
- [280] P. G. Wolynes. Symmetry and the energy landscapes of biomolecules. *Proceedings of the National Academy*, 93(25):14249–14255, 1996.
- [281] J. Wuttke. FRIDA: fast reliable inelastic data analysis. FRIDA.
- [282] J. Wuttke, A. Budwig, M. Drochner, H. Kämmerling, F. J. Kayser, H. Kleines, V. Ossovyi, L. C. Pardo, M. Prager, D. Richter, G. J. Schneider, H. Schneider, and S. Staringer. SPHERES, Jülich’s high-flux neutron backscattering spectrometer at FRM II. *Review of Scientific Instruments*, 83(7):075109, 2012.
- [283] J. Wuttke and M. Zamponi. Simulation-guided optimization of small-angle analyzer geometry in the neutron backscattering spectrometer SPHERES. *Review of Scientific Instruments*, 84(11):115108, 2013.
- [284] R. D. Young, H. Frauenfelder, and P. W. Fenimore. Mössbauer Effect in Proteins. *Physical Review Letters*, 107:158102, 2011.
- [285] G. Zaccai. How soft Is a Protein? A Protein Dynamics Force Constant Measured by Neutron Scattering. *Science*, 288:1604–1607, 2000.
- [286] E. Zaccarelli, G. Foffi, K. A. Dawson, S. V. Buldyrev, F. Sciortino, and P. Tartaglia. Confirmation of anomalous dynamical arrest in attractive colloids: A molecular dynamics study. *Physical Review E*, 66(4):041402, 2002.
- [287] Z. Zheng, J. Czaplicki, and O. Jardetzky. Backbone Dynamics of trp Repressor Studied by ^{15}N NMR Relaxation. *Biochemistry*, 34(15):5212–5223, 1995.
- [288] R. Zorn. Multiple scattering correction of neutron scattering elastic scans. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A*, 572(2):874–881, 2007.
- [289] R. Zwanzig. *Nonequilibrium Statistical Mechanics*. Oxford University Press, 1. edition, 2001.

A Anhang

A.1 Kraftfelder der MD-Simulationen

Das in den Simulationen mit Gromacs verwendeten Kraftfeld GROMOS-96 enthält folgende Terme [265, 266]:

Für die Bindungslänge b_{ij} wird das ein Potential mit vierter Potenz verwendet:

$$V_{\text{Bindung}}(\vec{r}_{ij}) = \frac{1}{4} k_{ij} \left(r_{ij}^2 - b_{ij}^2 \right)^2. \quad (\text{A.1})$$

Für die Bindungswinkel θ_{ijk} wird ein harmonisches Potential verwendet:

$$V_{\text{Winkel}}(\theta_{ijk}) = \frac{1}{2} k_{ijk}^{\theta} \left(\cos(\theta_{ijk}) - \cos(\theta_{ijk}^0) \right)^2. \quad (\text{A.2})$$

Für Diederwinkel ψ in Alkanen wird das Ryckaerts-Bellemans Potential verwendet:

$$V_{\text{Dieder}} = \sum_{n=0}^5 C_n \left(\cos(\psi) \right)^n. \quad (\text{A.3})$$

Für nichtbindende Wechselwirkungen wird das Lennard-Jones-Potential definiert:

$$V_{\text{Lennard-Jones}}(\vec{r}_{ij}) = \frac{C_{ij}^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}^6}{r_{ij}^6}. \quad (\text{A.4})$$

Die Coulomb-Wechselwirkung lautet:

$$V_{\text{Coulomb}}(r_{ij}) = f \frac{q_i q_j}{\epsilon_r r_{ij}^2} \frac{\vec{r}_{ij}}{r_{ij}} \quad (\text{A.5})$$

mit der relativen dielektrischen Konstante ϵ_r .

A.2 Weitere Ergebnisse von MD-Simulationen

Zum Vergleich mit der Winkelverteilung des Proteinrückgrats ist hier die Orientierungs-van-Hove-Funktion für Wasser bei verschiedenen Temperaturen gezeigt. Bei tiefen Temperaturen ähnelt die Wasserreorientierung der im Protein gefundenen Winkelverteilung.

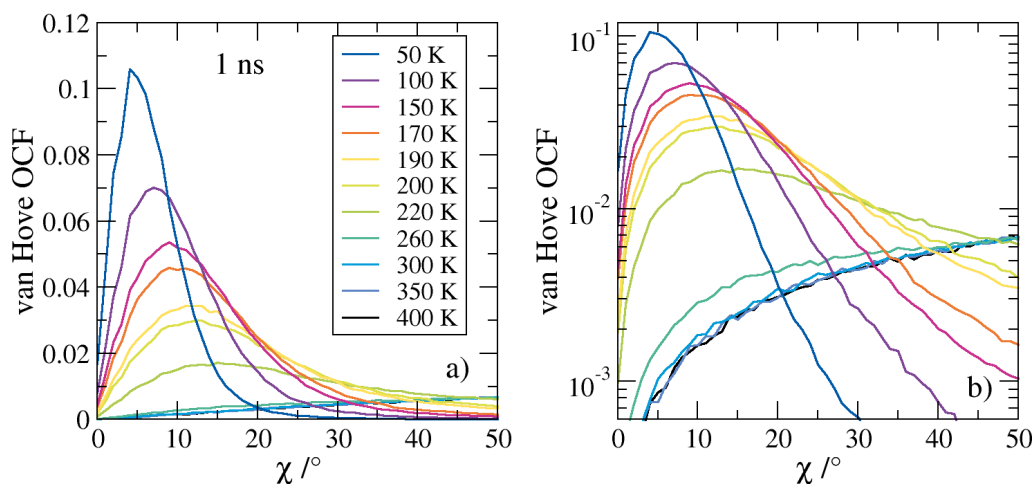


Abb. A.1: Orientierungs-van-Hove-Funktion für Wasser bei verschiedenen Temperaturen in (a) linearer Darstellung und (b) logarithmischer Darstellung.

A.3 Weitere Ergebnisse von Random-Walk-Simulationen

In Kapitel 6.2.1 wurden beispielhaft ausgewählte Ergebnisse der relativen zentralen Intensität vorgestellt. Um das Bild zu vervollständigen sind hier einige weitere Simulationsergebnisse teils als 3D-Darstellungen in Abhängigkeit von zwei Parametervariationen, teils als weitere zweidimensionale Spektren dargestellt.

Abbildung A.2 zeigt die Ergebnisse für die Modelle „Ratenänderung“ und „Amplitudenänderung“ bei Veränderung der Verteilungsbreite.

Abbildung A.3 zeigt die spektrale Breite und die relative zentrale Intensität der Spektren unter Annahme einer gauschen Winkelverteilung, die in [5, 118] vorgeschlagen wurde.

In Abbildung A.4 sind die spektrale Breite und die relative zentrale Intensität der Spektren unter Annahme einer Exponentialverteilung ohne Cutoff gezeigt.

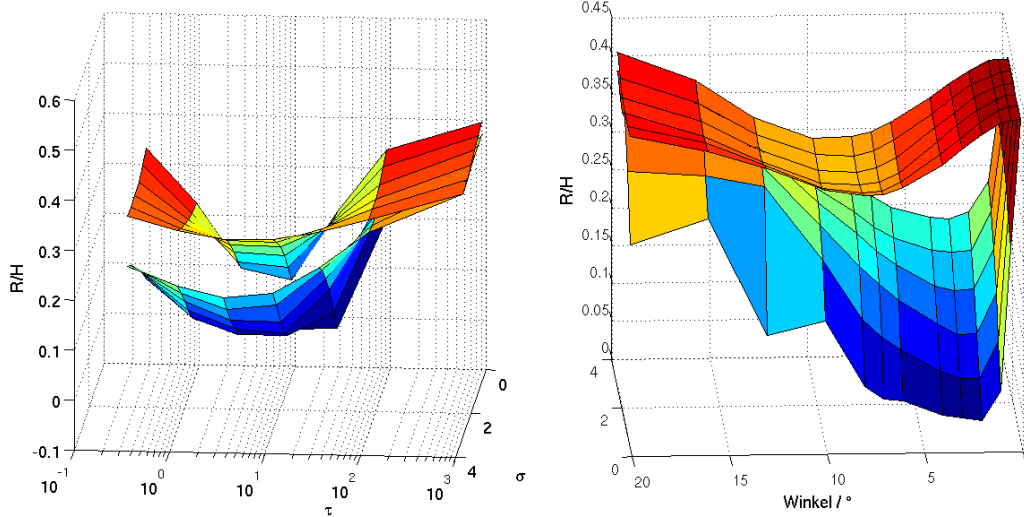


Abb. A.2: a) R/H bei $\omega = 0$ kHz eine Achse zeigt die Variation der Breite σ der Korrelationszeitenverteilung, die andere die Variation der Korrelationszeiten. Abb.6.8b) ist ein Schnitt entlang $\sigma = 0$. Die obere Schicht zeigt die Werte für $\Delta = 20 \mu\text{s}$, die untere Schicht zeigt $\Delta = 200 \mu\text{s}$ b) Variation von Verteilungsbreite σ und Winkel bei $\tau = 70 \mu\text{s}$. Ein Schnitt bei $\sigma = 3.5$ ergibt die Abbildung 6.8c).

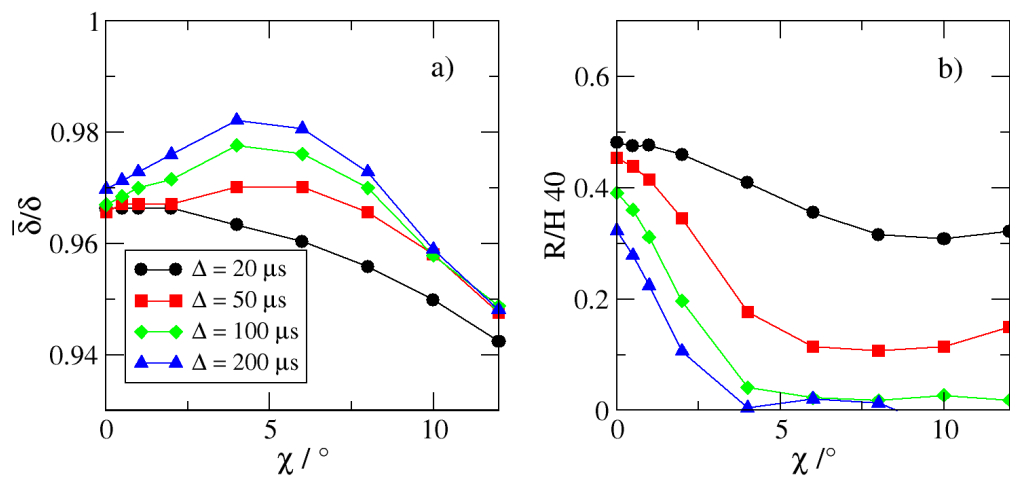


Abb. A.3: Spektrale Breite und relative zentrale Intensität von Spektren simuliert mit einer gaußschen Winkelverteilung.

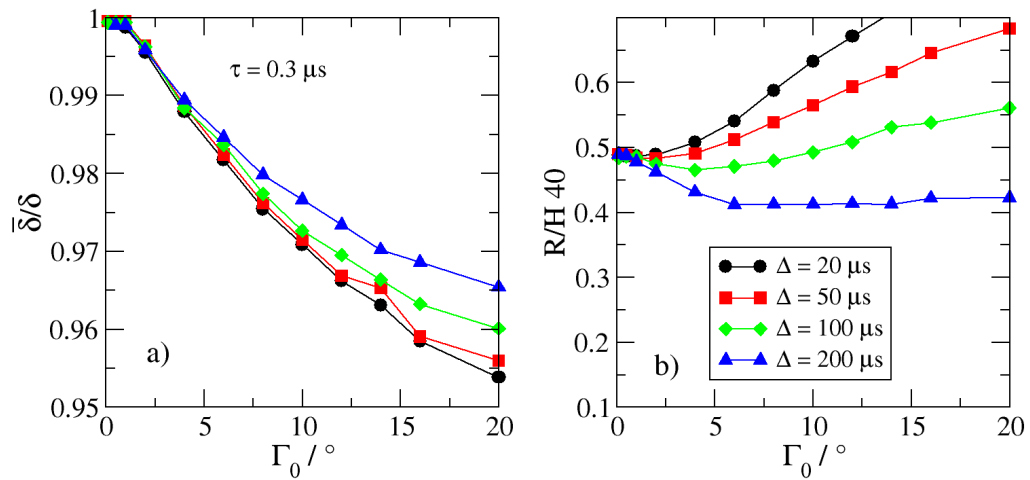


Abb. A.4: a) Spektrale Breite und b) relative zentrale Intensität von Spektren simuliert mit einer exponentiellen Winkelverteilung ohne Cutoff. Der Winkel Γ_0 bezeichnet je den charakteristischen Winkel der Exponentialverteilung $p(\gamma) = N \exp(-\gamma/\Gamma_0)$.

A.4 Programmcode zur T_1 -Berechnung nach Lipari und Szabo

Der Programmcode zur Berechnung der Spin-Gitter-Relaxationszeiten für einen Zufallssprung innerhalb eines Konus wurde von Oleg Petrov nach den Berechnungen von Lipari und Szabo [165, 166] geschrieben und anschließend angepasst:

```
// Description:
// Calculates a quadrupole T1 in the frame of a diffusion in a
// cone model according to G. Lipari and A. Szabo, J. Chem.
// Phys., 75, 2971 (1981)
// For the relationship between a reciprocal diffusion
// coefficient (the parameter TAU) and a correlation time, see
// Eq. (29) in G. Lipari and A. Szabo, Biophys. J., 30, 489
// (1980)
//
//-----
#include<iostream.h>
#include<fstream.h>
#pragma hdrstop
//-----
#pragma argsused

const float w = 2.*3.14159*46.1e6;
const float PI = 3.14159;
const float QCC = 170.e3;
const float THETA0_min = 1.;
```

```

const float THETA0_max = 15.;
const float TAU_min = 1.e-10;
const float TAU_max = 1.e-3;
const int M = 15; // number of steps for angle
const int N = 100; // number of steps for tau

float x0, G00, G10, G20, G0inf;
float TAU0, TAU0eff, TAU1, TAU1eff, TAU2, TAU2eff;
float THETA0, TAU, J1, J2, T1;

float g1(const float& TAU) {return 2.*TAU/(1.+w*w*TAU*TAU);}
float g2(const float& TAU) {return 2.*TAU/(1.+4.*w*w*TAU*TAU)
;}}

int main(int argc, char* argv[])
{
    ofstream outfile("outfile-smallangle-test.dat");
    if(!outfile) {
        cerr << "Error while oppening output file\n";
        exit(1);
    }
    THETA0 = THETA0_min;
    for(int i = 0; i < M; i++) {
        THETA0 = THETA0_min + (THETA0_max - THETA0_min)*i/(M -
            1.); // linear scale
        outfile << "THETA = " << THETA0 << "\n";

        x0 = cos(THETA0*PI/180.);

        G00 = (1./20.)*(x0*(1.+x0)*(9.*x0*x0-1.)+4.);
            //Equation 2.5a
        G10 = (1./10.)*(1.-x0)*((2.+x0)*(1.+3.*x0*x0)+3.*x0);
            //Equation 2.5b
        G20 = (1./40.)*(1.-x0)*(1.-x0)*(3.*x0*x0+9.*x0+8.);
            //Equation 2.5c
        G0inf = (0.5*x0*(1.+x0))*(0.5*x0*(1.+x0));
            //Equation 2.6

        TAU = TAU_min;
        for(int j = 0; j < N; j++) {
            TAU0 = TAU*(x0*x0*(1.+x0)*(1.+x0)*(log((1.+x0)/2.)
                +(1.-x0)/2.)/(2.*(x0-1.))//Equation 2.7a
                +(1.-x0)*(2.-x0-9.*x0*x0-7.*x0*x0*x0)
                /60.);

```

```

TAU0eff = TAU0/(G00-G0inf);
//Equation 2.9

TAU1 = TAU*(1.-x0)*(1.-x0)*(9.+32.*x0+44.*x0*x0+20.*
x0*x0*x0)/120.; //Equation 2.7b
TAU1eff = TAU1/G10;

TAU2 = TAU*(1.-x0)*(1.-x0)*(1.-x0)*(8.+12.*x0+5.*x0*
x0)/240.; //Equation 2.7c
TAU2eff = TAU2/G20;

J1 = (1./5.)*((G00-G0inf)*g1(TAU0eff) + 2.*G10*g1(
TAU1eff) + 2.*G20*g1(TAU2eff));
J2 = (1./5.)*((G00-G0inf)*g2(TAU0eff) + 2.*G10*g2(
TAU1eff) + 2.*G20*g2(TAU2eff));
T1 = 3./(2*PI*(3./4.)*2*PI*(3./4.)*QCC*QCC*(J1+4.*J2)
);

outfile << (7./24.)*(THETA0*PI/180.)*(THETA0*PI/180.)
*TAU << "\t" << T1 << "\n";
TAU = TAU*pow(TAU_max/TAU_min, 1./(N - 1.)); // log
scale

}
}

return 0;
}

```

A.5 Sequenzen der verwendeten Proteine

Zur Berechnung der Anteile von Protonen und austauschbaren Protonen in Kapitel 4 wurden folgende Sequenzen der Proteine verwendet.

A.5.1 Elastin

Sequenz von Elastin aus [237]:

```

MAGLTAAAPR PGVLLLLLSI LHPSRPGGVP GAIpGGVPGG VFYPGAGLGA
LG G GALPGG KPLKpVpGGL AGAGLGAGLG ADPAVTFpGA LVPGGVADAA
AAYKAAGA GLGGVpGVGG LGVSAGAVVP QPGAGVKPGK VPGVGLPGVY
PGGVLPGARF PGVGVLPpGVp TGAGVKpKAP GVGGAFAGIp GVGPFGGPQP
GVPLGYPIKA PKLPGGYGKP YTTGKLpYGP GPGGVAGAAG KAGYPTGTGV

```

GPQAAAAAA KAAAKFGAGA AGVLPGVGGA GVpGVpGAIp GIGGIAGVGT
 PAAAAA AAAA AKAAYGAAA GLVPGGpGFG PGVVGVPVGS VpGVGVpGAG
 IpVVpGAGIp GAAVPGVVSP EAAAKAAKA AKYGARPGVG VGGIPTYGVG
 AGGFPGFVG VGGIpGVAGV pSVGGVpGVG GVPGVGISPE AQAAAAAKAA
 KYGAAGAGVK GGLVpGpQAA VPGVPGTGGV pGVGTPAAAA AKAAAKAAQF
 ALLNLAGLVP GVGVPAGVG APGVGVApGV GLAPGVGVAP GVGVPAGVG
 APGIGpGGVA AAASAAKVA AKAQLRAAAG LGAGIpGLGV GVGVOGLGV
 AGVPGLGVGA GVpGFGAGAD EGVRRSLSP LREGDPSSSQ HLPSTSSPR
 VPGALAAKA AKYGAAVPGV LGGLGALGGV GIpGGVVGAG PAAAAAAKa
 AAKAAQFGLV GAAGLGGLGV GGLGXPGVGG LGGIPAAAA KAAKYGAAGL
 GGVLGAGQF PLGGVAARPG FGLSpIFpGG ACLGKACGRK RK

A.5.2 Myoglobin

Sequenz von Pferdemyoglobin aus dem Protein Data Bank Eintrag 1BZR von [128]:

MGLSDGEWQQ VLNWVGKVEA DIAGHGQEV LRLFTGHPET LEKFDKFKHL
 KTEAEMKASE DLKKHGT VVL TALGGILKKK GHHEAELKPL AQSHATKHKI
 PIKYLEFISD AIIHVLHSHK PGDFGADAQG AMTKALELFR NDIAAKYKEL
 GFQG

A.5.3 Cyano-Phycocyanin

Sequenz von CPC aus [50]:

Kette A:

MKTPITEAIA AADTQGRFLS NTELQAVDGR FKRAVASMEA ARALTNNAS
 LIDGAAQAVY QKFPYTTTMM GSQYASTPEG KAKCARDIGY YLRMVITYCLV
 AGGTGPMDEY LIAGLSEINS TFDLSPSWYI EALKYIKANH GLTGQAAVEA
 NAYIDYAINA LS

Kette B:

MLDAFAKVVA QADARGEFLT NAQFDALSNL VKEGNKRLDA VNRITSNAST
 IVANAARALF AEQPQLIQPG GNAYTNRRMA ACLRDMEIIL RYVTYAILAG
 DSSVLDDRCL NGLRETYQAL GTPGSSVAVA IQKMKDAAIA IANDPNGITP
 GDCSALMSEI AGYFDRAAAA VA

A.6 Streuintensität des Wasseranteils

In Kapitel 7 wurde für die Streuintensität des zweiten, q -abhängigen Prozesses gefunden, dass dieser q -abhängig ist. Dies ist an den Werten des Fitparameters A_1 der Gleichung 7.13) zu erkennen, der in Abbildung A.5 aufgetragen ist. Die Intensität nimmt

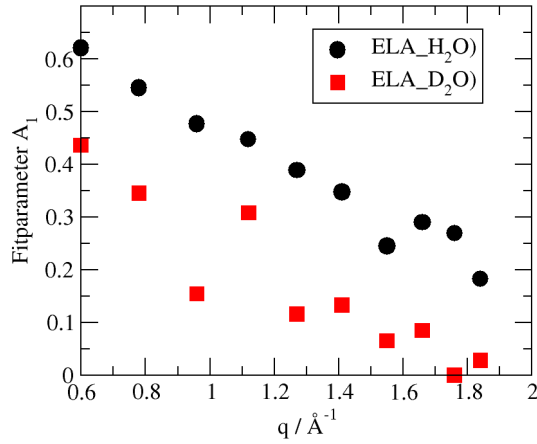


Abb. A.5: Anteil der durch Wasser verursachte Streuung im inelastischen Fensterscan bei verschiedenen Streuvektoren.

für beide Proben linear mit q ab.

Dieses Verhalten kann nicht durch einen einfachen diffusiven Prozess erklärt werden. Kompliziertere Modelle für Wasserdiffusion könnten die beobachtete q -Abhängigkeit der Diffusion auf zwei Arten erklären. Die Intensität bei einer festen Frequenz wird zum einen durch die Halbwertsbreite bestimmt, andererseits auch durch q -abhängige Vorfaktoren, wie sie z.B. bei Rotationsmodellen auftreten.

Teixera et al. untersuchten die q -Abhängigkeit der Halbwertsbreite für verschiedene Temperaturen [16]. Sie fanden eine deutliche Abweichung vom vorhergesagten diffusiven Gesetz $\Delta\omega = Dq^2$. Diese Halbwertsbreite ist mit sinkender Temperatur und steigendem Streuvektor zunehmend geringer und weicht immer stärker vom diffusiven Verhalten ab. Dies hat den Effekt auf die inelastische Fensterintensität, dass das Maximum der Inelastischen Fensterintensität schwächer von q abhängt, als bei normaler Diffusion.

Auch eine zusätzliche lokale q -unabhängige Bewegung hilft bei der Erklärung des Phänomens nicht weiter. Die Intensität der elastischen und quasielastischen Strukturfaktoren hängen von Besselfunktionen ab [16]. Jedoch steigt der Wert von der QISF für die gängigen Modelle mit q , während in den Messungen ein Absinken beobachtet wird. Dies ist beispielhaft in Abb. A.6 gezeigt. In Abb. A.6 (a) ist der QISF nach Gleichung (7.7) für eine Methylgruppe gezeigt. Die Intensität der quasielastischen Methylgruppenstreuung durchläuft im untersuchten Streuvektorbereich ein Maximum und kann das Absinken der relativen Wasserintensität nicht erklären. Würde sie kontinuierlich steigen, so ließe sich der sinkende Anteil des Wassers an der Gesamtstreuung erklären. Auch die in Abb. A.6(b) gezeigten Vorfaktoren einer isotropen Rotationsdiffusion,

$$A_l = (2l + 1)j_l^2(qR) \quad (\text{A.6})$$

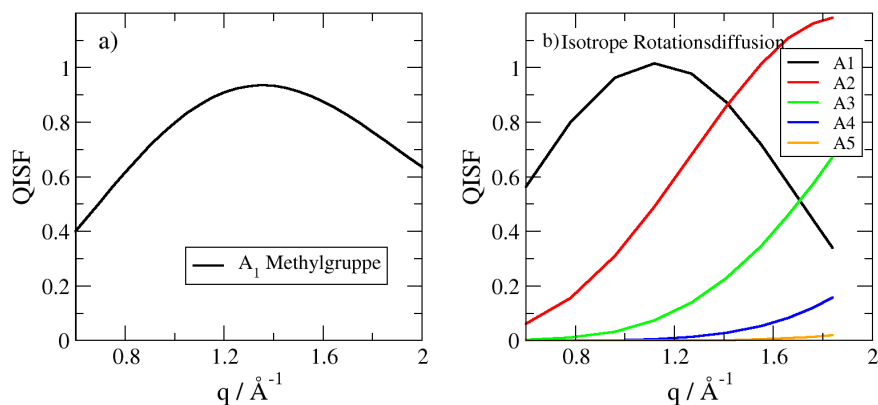


Abb. A.6: QISF für a) eine Dreiplatzsprungbewegung einer Methylgruppe, b) die verschiedenen Summanden der QISF einer isotropen Rotationsdiffusion.

wie sie beispielhaft für Wasser angenommen werden kann, führen zu einem Ansteigen der Streuintensität mit steigendem q . Für die Berechnung wurde R für den Interprotonenabstand im Wasser zu 1.63 \AA abgeschätzt.

Folglich bleibt bislang unklar, welches Modell für die Wasserreorientierung verwendet werden muss, um das gefundene Absinken der Streuintensität mit steigendem Streuvektor zu erklären.

Lebenslauf

Akademische Ausbildung

ab 10/2004	Studium an der Universität Kassel Studienfach: Nanostrukturwissenschaft
09/2007-01/2008	Auslandssemester in Frankreich an der Université de Bordeaux 2 Studienfach: Strukturelle Biochemie
10/2008-12/2009	Diplomarbeit an der Universität Kassel bei Prof. A. Ehresmann (Experimentalphysik) und Prof. F. Herberg (Biochemie) Thema: Aufbau und Theorie eines magneto-optischen Oberflächenplasmonresonanz-Messplatzes
07/2010-12/2014	Promotion an der Universität Darmstadt bei Prof. M. Vogel (Festkörperphysik) Thema: Untersuchung von Protein- und Hydratationswasserdynamik mit Experimenten und Simulationen.

Publikationsliste

Aus dieser Arbeit gingen folgende Publikationen hervor:

- A. Bormuth, A. Janz, K. Kämpf, F. Klameth, M. Vogel, „Logarithmic-like relaxation of hydrated peptides“, AIP Conference Proceedings, 1459, 11-14, (2012).
- K. Kämpf, F. Klameth, M. Vogel, „Power-law and logarithmic relaxations of hydrated proteins: A molecular dynamics simulations study“, Journal of Chemical Physics, Vol. 137, No. 20., 205105 (2012).
- K. Kämpf, B. Kremmling, M. Vogel, „A vanishing amplitude of backbone dynamics causes a true protein dynamical transition: ^2H NMR studies on perdeuterated C-Phycocyanin“, Physical Review E, 89, 032710 (2014).
- M. Rosenstihl, K. Kämpf, F. Klameth, M. Sattig, M. Vogel, „Dynamics of interfacial water“, Journal of Non Crystalline Solids (in press) (2014).

Danke

Die Doktorarbeit zu schreiben war ein wichtiger Bestandteil meines Lebens. Ich bin allen Menschen dankbar, die mich in dieser Zeit begleitet haben. Sie alle zu nennen würde den Rahmen hier sprengen, ich beschränke mich daher auf die allerwichtigsten und jene, die mich wissenschaftliche begleitet haben. Ich danke:

- meiner Oma für ihr Interesse an den Naturwissenschaften.
- meiner Familie für die Unterstützung in allen Lebenslagen!
- Prof. Michael Vogel für die Bereitschaft mich als „Quereinsteiger“ in die Physik als Doktorandin anzunehmen und die intensive Betreuung der Arbeit.
- Prof. Franz Fujara für die wissenschaftlichen Diskussionen über die QENS-Daten, die Anregungen zum Thema Zeit in der Physik und das Übernehmen des Zweitgutachtens.
- Felix Klameth für das unkomplizierte Teilen des Büros, die Fotos für den gemeinsamen Kalender und das vielen Gespräche zwischendurch.
- Matthias Sattig für die wissenschaftlichen Diskussionen, die regelmäßige Erinnerung an den Feierabend und den sportlichen Ausgleich.
- Dominik Demuth für die permanente Ansprechbarkeit, für Literaturanregungen in vielen Hinsichten, fürs geduldige gemeinsame Durchdenken verschiedenster Probleme.
- Oleg Petrov für das Programm zur Berechnung von T_1 .
- Michael Haaks fürs Zuhören und Mitdenken bei wissenschaftlichen Fragestellungen aller Art und die Hilfe bei xmgrace und LaTeX.
- Markus Rosenstihl insbesondere für das Schreiben eines Programms zur Konvertierung von SPC-Dateien aber darüber hinaus auch für die stete prompte Hilfe, und fürs einfach alles wissen, was mit Linux zu tun hat.
- Michael Haaks, Matthias Sattig und Dominik Demuth für die nicht ganz so regelmäßigen, aber immer hilfreichen Seminare zu Thema NMR-Theorie.
- Beke Kremmling für die gute Dokumentation ihrer NMR-Messungen, die es mir leicht machte, an dem Thema weiterzuarbeiten.
- den Bachelorstudenten Tatjana Thiel, Sarah Schneider und Kai Stroh für ihr Interesse am Thema und die gute Zusammenarbeit.
- Herrn Fischer für die Hilfe bei Probenpräparation und den begeisterten Einsatz bei der Probencharakterisierung.
- Benjamin Kresse und Alexej Privalov für die Betreuung der Field-Cycling Messungen.

-
- Prof. Bernd Stühn für die wissenschaftlichen Diskussionen über DSC-Spektren und QENS-Daten.
 - Christina Lederle und Tina Nickels für die Hilfe bei den DSC-Messungen.
 - Markus Appel für Literaturanregungen zum Thema inelastische Fenstermessungen.
 - Marie Kahse und Prof. Winter für die Betreuung bei den beiden Messzeiten in Dortmund und die gute Zusammenarbeit.
 - Joachim Wuttke und Michaela Zamponi für die Betreuung der Experimente am FRMII.
 - Anna Vyvoceva und Alexej Nesterov für die Russischstunden.
 - Barbara Böttcher für die freundlichen Gespräche zwischendurch und das schnelle und zuverlässige Erledigen verschiedenster administrativer Aufgaben.
 - Jens Wehner, Lotta Heckmann, Michael Haaks, Matthias Sattig und Dominik Demuth fürs Korrekturlesen.
 - allen Mitgliedern der AGs Vogel und Fujara für die gute Arbeitsatmosphäre.
 - der AG Drossel für die freundliche Aufnahme während der Sportpausen!
 - Jan Gabriel für intensive wissenschaftliche und nichtwissenschaftliche Diskussionen, fürs einfach-so-im-Büro-Vorbeikommen, fürs gemeinsame Musizieren, die Judostunden und das Schwimmen!
 - Lotta Heckmann für das gemeinsame Einarbeiten, viele gemeinsame Unternehmungen, mehrfaches Zimmerteilen, das morgendliche Joggen auf Reisen, die Organisation des Schülerinnen-Projekttags, für so so vieles!
 - Anne Sauerwein und Jan Ungelenk fürs offene Ohr, fürs Verständnis, für euer Interesse und das Kontakthalten. Für eure Freundschaft!
 - Daniel Barthel für die kontinuierliche Begleitung und Ermutigung sowie die Ideen es leichter zu erklären.
 - Hans Becker für interessante, nichtwissenschaftliche Leseanregungen.
 - Chan Yong Schüle für die moralische und kulinarische Unterstützung in der Endphase.
 - der jungen DPG für die vielen Einblicke und die Möglichkeit eigene Ideen umzusetzen.
 - der Forschergruppe dafür, dass ich als externes Mitglied so freundlich aufgenommen wurde und an den Seminaren teilnehmen durfte.
 - der Studienstiftung des Deutschen Volkes für die ideelle Förderung.
 - dem Fonds der Chemischen Industrie für die finanzielle Förderung.